

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Dissociando anedonia de outros sintomas da depressão na doença de Parkinson em um modelo experimental em ratos: papel do estriado dorsolateral e do córtex pré-frontal

Filipe Carvalho Matheus

Florianópolis

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Dissociando anedonia de outros sintomas da depressão na doença de Parkinson em um modelo experimental em ratos: papel do estriado dorsolateral e do córtex pré-frontal

Filipe Carvalho Matheus

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

**Orientador: Dr. Rui Daniel S. Prediger
Coorientador: Dr. Leandro José Bertoglio**

**Florianópolis
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Matheus, Filipe Carvalho

Dissociando anedonia de outros sintomas da depressão na
doença de Parkinson em um modelo experimental em ratos :
papel do estriado dorsolateral e do córtex pré-frontal /
Filipe Carvalho Matheus ; orientador, Rui Daniel Schröder
Prediger ; coorientador, Leandro José Bertoglio. -
Florianópolis, SC, 2015.

179 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3. Dopamina. 4.
Depressão. I. Daniel Schröder Prediger, Rui. II. Bertoglio,
Leandro José. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

**"Dissociando anedonia de outros sintomas da depressão na doença de Parkinson
em um modelo experimental em ratos: papel do estriado dorsolateral e do
córtex pré-frontal"**

Por

Filipe Carvalho Matheus

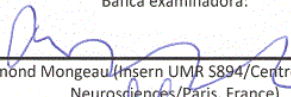
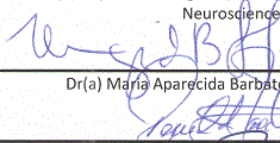
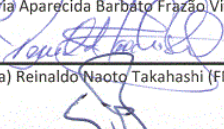

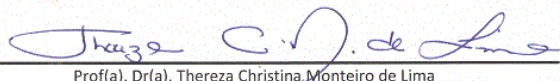
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (005/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia –
UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (FMC/CCB/UFSC)

Banca examinadora:


Dr(a) Raymond Mongeau (Inserm UMR S894/Centre de Psychiatrie et
Neurosciences/Paris, France)
Dr(a) Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (DFAR/BIO/UFPR)
Dr(a) Reinaldo Naoto Takahashi (FMC/CCB/UFSC)
Dr(a) Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)
Dr(a) Thereza Cristina Monteiro de Lima (FMC/CCB/UFSC)
Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 27 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua dedicada orientação, pela amizade durante o convívio em seu laboratório e por contribuir com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, que abriu as portas de seu laboratório e auxiliou muito na execução desse trabalho.

Ao professor Dr. Rodrigo Cunha, pela colaboração e amizade durante o tempo que trabalhamos juntos durante o meu doutorado sanduíche na Universidade de Coimbra e pelas valiosas sugestões para esse trabalho.

Aos grandes amigos Daniel Rial, Cristina Lemos e Joana Real, pela colaboração estabelecida em Coimbra que permitiu o engrandecimento desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Aos professores Dr. Geison Izídio, Dr. Giles A. Rae, Dr^a. Maria Vital, Dr. Raymond Mongeau, Dr. Reinaldo Naoto Takahashi e Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima pela colaboração na avaliação e no aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) Ana Cristina Guerra de Souza, Ana Elisa Speck, Andréia Cunha, Angela França, Daniel Rial, Eduardo Moreira, Fernanda Barros, Josiel Mack, Jozimar Szczepanik, Juliana Ben, Morgana Moretti, Paulo Oliveira, Samantha Lopes, Sandro Wopereis, Tuane Sampaio e Vanessa Valgas, pela amizade e agradável convivência durante estes quatro anos.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia Evelyn Santos, Maíra Bicca e Paulo Oliveira, pela amizade em todos os momentos.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da Pós-graduação.

Aos meus amados pais, Ismael e Iolanda Matheus, meu querido irmão, Diogo, e toda a minha família, pelo carinho através de telefonemas, e-mails e nas minhas raras visitas a Minas Gerais.

Ao Madson Caminha e sua família que estiveram comigo em todos os momentos me apoiando durante esses anos.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram na execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante este período.

A CAPES pelo suporte financeiro e bolsa concedida para realização do doutorado sanduíche.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.” (Benjamin Disraeli)

RESUMO

striado dorsolateral (EDL) é uma estrutura encefálica envolvida com o processamento de funções motoras, cognitivas e emocionais, que na doença de Parkinson (DP) ela sofre degeneração de neurônios dopaminérgicos. Esta degeneração dopaminérgica nigroestriatal também afeta outras áreas do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal (CPF), que tem sido associado com o aparecimento dos sintomas cognitivos em fases pré-motoras da DP. No presente trabalho, utilizou-se abordagens comportamentais, neuroquímicas e eletrofisiológicas para investigar a dissociação temporal (7 ou 21 dias) entre o papel do EDL e do CPF no aparecimento de comportamentos relacionados à anedonia e à depressão em ratos submetidos à lesões bilaterais do EDL com 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A administração de 6-OHDA gerou uma degeneração parcial de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal induzindo prejuízos motores na maior dose testada (20 µg/sítio de injeção). No entanto, as doses mais baixas de 6-OHDA (5 e 10 µg/sítio de injeção) não induziram prejuízos das funções motoras. Comportamentos relacionados à anedonia foram observados no teste do esguicho e no teste do consumo de sacarose 7 dias após a lesão com 6-OHDA. Em contrapartida, alterações nos comportamentos relacionados à depressão avaliados nos testes da natação forçada e da interação social só foram evidentes 21 dias após a lesão com 6-OHDA, quando os comportamentos relacionados à anedonia não estavam mais presentes. Essa dissociação temporal nos prejuízos comportamentais apresentados foi relacionada a alterações dependentes do tempo e da estrutura encefálica (EDL ou CPF) em marcadores dopaminérgicos, como os receptores D1 (D1R) e D2 (D2R) para a dopamina e o transportador de dopamina (DAT). Os resultados eletrofisiológicos mostraram alterações dependentes do tempo na sensibilidade de neurônios do EDL e no CPF à dopamina que podem estar associadas às alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela 6-OHDA. O tratamento durante 7 ou 21 dias com fluoxetina (10 mg/kg), bupropiona (10 mg/kg) ou quinpirole (0,1 mg/kg) preveniu o aparecimento dos comportamentos relacionados à anedonia e à depressão induzidos pela 6-OHDA. Esses resultados fornecem a primeira demonstração de um envolvimento dissociado do EDL e do CPF em comportamentos relacionados à anedonia e à depressão, respectivamente em ratos submetidos a um modelo animal da DP. As flutuações temporais na densidade de receptores dopaminérgicos

e na sua funcionalidade podem conduzir a alterações na sensibilidade do sistema dopaminérgico nestas duas estruturas cerebrais. Os resultados do presente trabalho são inovadores, pois desvendam alguns mecanismos relacionados ao sistema dopaminérgico que podem estar envolvidos com a dualidade entre os sintomas depressivos e anedônicos na DP.

Palavras-chave: eletrofisiologia, nado forçado, consumo de sacarose, fluoxetina, bupropiona, quinpirole, dopamina.

ABSTRACT

dorsolateral striatum (DLS) processes motor and non-motor functions and undergoes extensive dopaminergic degeneration in Parkinson's disease (PD). This nigrostriatal dopaminergic degeneration also affects other brain areas including the prefrontal cortex (PFC), which has been associated with the appearance of non-motor symptoms of PD. Using behavioral, neurochemical and electrophysiological approaches, we investigated the temporal dissociation (7 or 21 days) between the role of the DLS and PFC in the appearance of anhedonia and helplessness behavior in rats submitted to bilateral DLS lesions with 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The 6-OHDA induced a partial dopaminergic nigrostriatal damage with motor impairments being observed only at the highest tested dose (20 μ g/site). However, the lower 6-OHDA doses (5 and 10 μ g/site) did not induce such impairments. Anhedonic-like behaviors were observed in the splash and sucrose consumption tests at 7 days after 6-OHDA lesion. In contrast, helplessness behaviors, as evaluated in the forced swimming and social interaction tests only emerged 21 days after 6-OHDA lesion when anhedonia was no longer present. These temporally dissociated behavioral alterations were coupled to temporal- and structure-dependent alterations in dopaminergic markers such as dopamine D₁ and D₂ receptors and dopamine transporter (DAT), leading to altered dopamine sensitivity in DLS and PFC circuits, evaluated electrophysiologically. Treatments during 7 or 21 days with fluoxetine (10 mg/kg), bupropion (10 mg/kg) or quinpirole (0.1 mg/kg) prevented the onset of impairments in anhedonic-like and helpless behaviors. These results provide the first demonstration of a dissociated involvement of the DLS and PFC in anhedonic- and helplessness behaviors in an animal model of PD, which was linked with temporal fluctuations in density and functionality of dopaminergic receptors. Leading to altered dopaminergic system sensitivity in these two brain structures. This study sheds new light to the duality between depressive and anhedonic symptoms in PD.

Key words: electrophysiology, forced swim, sucrose preference, fluoxetine, bupropion, quinpirole, dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exposição às toxinas ambientais e sua implicação no desenvolvimento da DP.....	27
Figura 2.	Imagens marcadas para DAT por sonografia transcraniana.....	29
Figura 3.	Vias anatômicas afetadas na doença de Parkinson....	30
Figura 4.	Representação coronal de cérebro de rato (hemisfério esquerdo) em diferentes níveis no sentido rostro-caudal.....	37
Figura 5.	Campo aberto.....	46
Figura 6.	Rotarod.....	47
Figura 7.	Teste da força de preensão plantar.....	48
Figura 8.	Primeiro protocolo experimental.....	51
Figura 9.	Influência de diferentes doses de 6-OHDA na imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) no estriado dorso-lateral.....	53
Figura 10.	Influência de diferentes doses de 6-OHDA na imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra (SN) de ratos.....	55
Figura 11.	Influência de diferentes doses de 6-OHDA na coloração de Fluoro-Jade B (FJB) no estriado dorso-lateral (EDL) e na substância negra (SN) de ratos.....	57
Figura 12.	Influência de diferentes doses de 6-OHDA na avaliação de funções motoras.....	59
Figura 13.	Sistemas de neurotransmissão envolvidos com as funções dos neurônios estriatais da espinha média...	73
Figura 14.	Protocolo experimental do teste de preferência por sacarose.....	76
Figura 15.	Comportamentos avaliados no teste do nado forçado na sessão de teste.....	78
Figura 16.	Fotografias ilustrando os comportamentos sociais usualmente observados no teste de interação social..	79
Figura 17.	Estrutura do labirinto em cruz elevado (LCE).....	80
Figura 18.	Posicionamento dos eletrodos de estimulação e das micropipetas de registro.....	84

Figura 19.	Protocolo experimental: sintomas não motores.....	87
Figura 20.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os parâmetros do teste do nado forçado.....	89
Figura 21.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre comportamentos relacionados à anedonia	91
Figura 22.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social.....	93
Figura 23.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre comportamentos relacionados à ansiedade no LCE..	94
Figura 24.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os níveis dos marcadores dopaminérgicos no estriado avaliados por <i>Western blotting</i>	96
Figura 25.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os níveis dos marcadores dopaminérgicos no CPF avaliados por <i>Western blotting</i>	98
Figura 26.	Registros eletrofisiológicos extracelulares obtidos em fatias de EDL e CPFm.....	100
Figura 27.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para a curva de estímulo/resposta em fatias de EDL e CPFm pré-límbico.....	101
Figura 28.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para a estimulação de pulsos pareados em fatias de EDL e CPFm pré-límbico.....	102
Figura 29.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade a dopamina em fatias de EDL 7 dias após a injeção.....	104
Figura 30.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade a dopamina em fatias de CPFm pré-límbico 7 dias após a injeção.....	106
Figura 31.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade à dopamina em fatias de EDL 21 dias após a injeção.....	108
Figura 32.	Efeitos da injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre os	

	registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade à dopamina em fatias de CPFM pré-límbico.....	110
Figura 33.	Protocolo experimental: tratamentos farmacológicos.....	126
Figura 34.	Avaliação dos efeitos do tratamento com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole no teste da preferência por sacarose 7 dias após a injeção bilateral de 6-OHDA.....	128
Figura 35.	Avaliação dos efeitos do tratamento com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole no teste do esguicho 7 dias após a injeção bilateral de 6-OHDA.....	130
Figura 36.	Efeitos do tratamento com bupropiona durante 21 dias frente aos prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social.....	132
Figura 37.	Efeitos do tratamento com fluoxetina durante 21 dias frente aos prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social.....	133
Figura 38.	Efeitos do tratamento com quinpirole durante 21 dias frente aos prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA intra-EDL sobre comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social.....	134
Figura 39.	Resumo dos resultados obtidos com o modelo experimental da 6-OHDA.....	145

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Estudos da literatura que induziram alterações comportamentais não motoras pela injeção de 6-OHDA.....	41
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ATP: adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)
ANOVA: análise de variância
ADT: antidepressivos tricíclicos
ATV: área tegmentar ventral
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
COMT: catecol-O-metiltransferase
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CPF: córtex pré-frontal
CPFm: córtex pré-frontal medial
D1R: receptor do tipo 1 para a dopamina
D2R: receptor do tipo 2 para a dopamina
D3R: receptor do tipo 3 para a dopamina
D4R: receptor do tipo 4 para a dopamina
DAT: transportador de dopamina (do inglês *dopamine transporter*)
DP: doença de Parkinson
DSM: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
EPM: erro padrão da média
EDL: estriado dorsolateral
EDM: Estriado dorsomedial
FJB: fluoro-Jade B
GABA: ácido gama-aminobutírico
GPe: globo pálido externo
GPI: globo pálido interno
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL: infralímbico
i.p.: via intraperitoneal
IRSN: inibidor da recaptação da serotonina e da noradrenalina
ISRS: inibidores seletivos da recaptação de serotonina
IT: neurônios intratelencélicos
LCE: labirinto em cruz elevado
L-Dopa: levodopa
MAO-B: monoamino oxidase B
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NMDA: N-metil-D-aspartato

NST: núcleo subtalâmico

PL: pré-límbico

PPS: estimulação de pulso emparelhados (do inglês *paired pulse stimulation*)

PVC: policloreto de vinila

rpm: rotações por minuto

SNC: sistema nervoso central

SN: substância negra

SNC: substância negra parte compacta

SNr: substância negra parte reticulada

TH: tirosina hidroxilase

TP: neurônios do trato piramidal

SUMÁRIO

1. Capítulo 1: Doença de Parkinson.....	25
1.1 Introdução.....	26
1.1.1 Epidemiologia e etiologia.....	26
1.1.2 Neuropatologia e sintomatologia.....	28
1.1.3 Diagnóstico e tratamento farmacológico.....	32
2. Capítulo 2: Padronização do modelo experimental da DP....	35
2.1 Introdução.....	36
2.1.1 O estriado no contexto da doença de Parkinson.....	36
2.1.2 6-Hidroxidopamina: uma toxina antiga que se reinventa.....	39
2.2 Justificativa do trabalho.....	43
2.3 Objetivo geral.....	43
2.3.1 Objetivos específicos.....	43
2.4 Material e métodos.....	44
2.4.1 Animais.....	44
2.4.2 Drogas.....	44
2.4.3 Cirurgia estereotáxica para injeção da neurotoxina 6-hidroxidopamina.....	44
2.4.4 Testes comportamentais.....	45
2.4.4.1 Campo aberto.....	45
2.4.4.2 Rotarod.....	46
2.4.4.3 Força de preensão plantar.....	47
2.4.5 Quantificação de tirosina hidroxilase por imunoistoquímica.....	48
2.4.6 Coloração de Fluoro Jade B.....	49
2.4.7 Análises estatísticas.....	50
2.4.8 Primeiro protocolo experimental.....	50
2.5 Resultados.....	52
2.5.1 Padronização do protocolo de injeção de 6-OHDA intra-estriatal: definição de dose.....	52
2.6 Discussão.....	60
2.7 Conclusões.....	62
3. Capítulo 3: Dissociando anedonia e depressão no modelo experimental da 6-OHDA em ratos.....	63
3.1 Introdução.....	64
3.1.1 Depressão: a principal comorbidade na doença de Parkinson.....	64

3.1.2	A neurobiologia da depressão na doença de Parkinson.....	65
3.1.3	Manifestações clínicas da depressão na doença de Parkinson.....	66
3.1.4	Estudos pré-clínicos da depressão na doença de Parkinson.....	68
3.1.5	Anedonia na doença de Parkinson.....	68
3.1.6	Córtex pré-frontal no contexto da doença de Parkinson.....	71
3.2	Objetivos específicos.....	74
3.3	Material e métodos.....	75
3.3.1	Testes para avaliação dos parâmetros não motores..	75
3.3.1.1	Preferência por sacarose.....	75
3.3.1.2	Teste do esguicho.....	77
3.3.1.3	Teste do nado forçado.....	77
3.3.1.4	Interação social.....	78
3.3.1.5	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	79
3.3.2	<i>Western blotting</i> para marcadores dopaminérgicos (D1R, D2R e DAT).....	81
3.3.3	Eletrofisiologia extracelular.....	82
3.3.3.1	Preparação das fatias.....	82
3.3.3.2	Registros eletrofisiológicos extracelulares	82
3.3.3.3	Estimulação por pulsos pareados (PPS do inglês paired pulse stimulation).....	85
3.3.3.4	Experimento de sensibilidade à dopamina	85
3.3.4	Análises estatísticas.....	85
3.3.5	Protocolo experimental.....	85
3.4	Resultados.....	88
3.4.1	Seleção da dose de 6-OHDA que gera prejuízos não motores.....	88
3.4.2	A injeção intra-EDL de 6-OHDA induz comportamentos relacionados à anedonia 7 dias após a indução da lesão.....	90
3.4.3	A injeção intra-EDL de 6-OHDA induz comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social 21 dias após a indução da lesão.....	92
3.4.4	A lesão por 6-OHDA no EDL induz alterações tempo-dependentes nos níveis de marcadores do	

	sistema dopaminérgico no estriado e no CPF.....	95
3.4.5	Efeitos da injeção de 6-OHDA no EDL sobre parâmetros eletrofisiológicos no estriado e CPF.....	99
3.4.6	A injeção de 6-OHDA intra-EDL induz alterações na sensibilidade à dopamina no EDL e no CPFm pré-límbico: dissociação temporal e estrutural.....	103
3.5	Discussão.....	111
3.6	Conclusões.....	119
4.	Capítulo 4: Tratamentos farmacológicos para os sintomas anedônicos e depressivos na DP.....	120
4.1	Introdução.....	121
4.2	Objetivos específicos.....	123
4.3	Material e métodos.....	124
4.3.1	Drogas.....	124
4.3.2	Tratamentos.....	124
4.3.3	Análises estatísticas.....	124
4.3.4	Protocolo experimental.....	124
4.4	Resultados.....	127
4.4.1	Os tratamentos com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole durante sete dias previnem os comportamentos relacionados à anedonia induzidos pela 6-OHDA.....	127
4.4.2	Os tratamentos com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole durante vinte e um dias previnem os comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social induzidos pela 6-OHDA.....	135
4.5	Discussão.....	140
4.6	Conclusões.....	140
5.	Capítulo 5: Considerações finais.....	141
6.	Referências bibliográficas	146
7.	Anexo: publicações durante o período do doutorado.....	176

1 Capítulo 1:

Doença de Parkinson

1.1 Introdução

1.1.1 Epidemiologia e etiologia

O fato de estarmos vivendo mais coloca um enorme desafio: o aumento da incidência das doenças associadas ao envelhecimento. Dentre essas “doenças da idade”, destaca-se a doença de Parkinson (DP) (DORSEY *et al.*, 2007). Aproximadamente 5 milhões de pessoas são portadoras da DP no mundo, sendo que estudos de incidência sugerem que o número de indivíduos portadores desta doença irá duplicar até o ano de 2030 (DORSEY *et al.*, 2007). Atualmente, estima-se que no Brasil existam aproximadamente 220 mil parkinsonianos. No entanto, esse dado pode estar subestimado, visto que foi obtido no censo de 2000 realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000) e existe uma carência de estatísticas nacionais mais recentes. A previsão para o Brasil é que esse número aumente para 340 mil em 2030 (DORSEY *et al.*, 2007). A DP afeta aproximadamente 1% da população acima dos 60 anos de idade, sendo que essa porcentagem aumenta com o envelhecimento (DE LAU & BRETELER, 2006).

A etiologia primária da DP permanece desconhecida, entretanto existe um consenso quanto a sua característica multifatorial. O envelhecimento representa o principal fator de risco para o seu surgimento, conforme a idade avança a incidência da DP aumenta. Além deste, outros fatores que podem aumentar a incidência desta doença são: o histórico familiar (KENNEDY *et al.*, 2003) e a exposição a contaminantes ambientais como alguns tipos de metais, vírus e agrotóxicos (POSTUMA & MONTPLAISIR, 2009).

A exposição a contaminantes ambientais estaria relacionada com o maior risco do desenvolvimento da DP idiopática (sem uma etiologia definida) e parece implicado em aproximadamente 90% dos casos (GOLDMAN, 2014). Em 1983, observou-se que usuários de heroína contaminada com o derivado da meperidina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) desenvolveram sintomas característicos da DP (LANGSTON *et al.*, 1983). Em seguida, houve a constatação de que o MPTP era capaz de matar seletivamente os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc) (LANGSTON *et al.*, 1984). Esse foi o ponto inicial para teorizar sobre o envolvimento de toxinas ambientais no desenvolvimento da DP. Outras substâncias também estão possivelmente envolvidas, dentre elas os pesticidas (paraquat, rotenona e maneb) e os metais pesados (ferro, manganês, cobre, alumínio e zinco;

para revisão ver DI MONTE, LAVASANI & MANNING-BOG, 2002; CICCHETTI DROUIN-OUELLET & GROSS, 2009).

A exposição do indivíduo às toxinas ambientais durante o desenvolvimento ou mesmo na idade adulta, poderia afetar a função neuronal. Esse contato inicial geraria danos em longo prazo que trariam como consequência uma perda neuronal significativa. Assim, o número de neurônios dopaminérgicos diminuiria para níveis inferiores ao necessário para sustentar a função motora normal. Soma-se a isso o desgaste associado ao envelhecimento. Esse quadro geraria o aparecimento da DP (**Fig. 1**) (LANDRIGAN *et al.*, 2005).

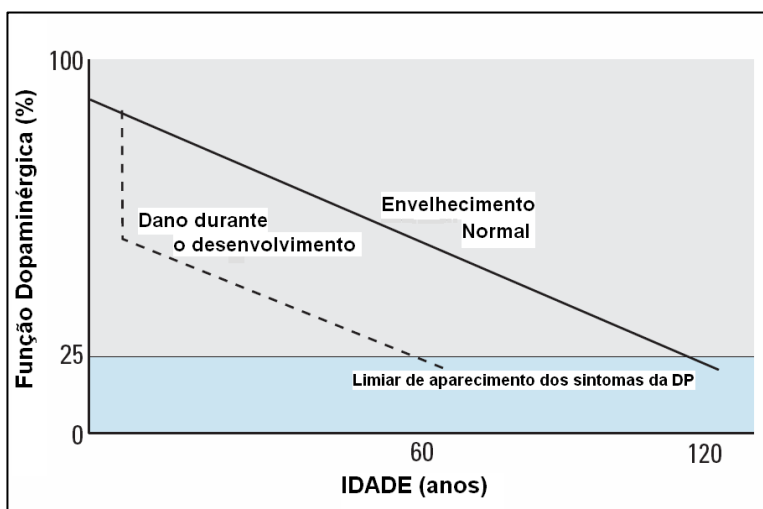


Figura 1: Exposição às toxinas ambientais e sua implicação no desenvolvimento da doença de Parkinson. Os efeitos não são percebidos imediatamente, porém anos mais tarde ocorre o surgimento dos sintomas motores da doença de Parkinson (modificado de LANDRIGAN *et al.*, 2005).

Teorias mais recentes postulam que o somatório dos fatores ambientais e genéticos seria o ponto crítico para o surgimento da DP (para revisão ver GOLDMAN, 2014). Indivíduos predispostos geneticamente estariam mais susceptíveis ao desenvolvimento desta doença.

Diversos genes já foram identificados como especialmente importantes para o aparecimento de características da DP (VERSTRAETEN, THEUNS, VAN BROECKHOVEN, 2015). O gene

SNCA está relacionado à progressão rápida e à sinucleinopatia tanto na forma familiar quanto na forma idiopática da DP. Já outros genes, como o PARK2 e o PARK7, estão relacionados à progressão lenta da forma familiar da DP e ao acúmulo ou não de alfa-sinucleína, respectivamente. Outros genes como o LRRK2, o PINK1 e o SYNJ1 que estão envolvidos com características diversas da DP. Alterações nestes genes possuem importância para o prognóstico da DP, seja em casos de aparecimento precoce dos sintomas ou em casos tardios (VERSTRAETEN, THEUNS, VAN BROECKHOVEN, 2015).

Dessa maneira, a epigenética surge com novos conceitos bastante atraentes de que as mudanças hereditárias na expressão gênica, que independem de alterações na sequência primária do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) (MARSIT, 2015) poderiam estar relacionadas com o surgimento da DP. Genes ligados à DP sofreriam alterações epigenéticas através de contaminantes ambientais (SINGH *et al.*, 2014; FENG, JANKOVIC & WU, 2015).

1.1.2 Neuropatologia e sintomatologia

As principais características neuropatológicas da DP são: a perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e a presença em nível intracelular dos corpos de Lewy, que são inclusões citoplasmáticas formadas predominantemente pela proteína alfa-sinucleína, além de ubiquitina, parkina e neurofilamentos. Apesar dos corpos de Lewy não serem um marcador específico da DP, estes são encontrados tanto nas formas idiopática, quanto genética da doença (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Outro marcador que recentemente está sendo relacionado à DP é o transportador de dopamina (DAT, do inglês *dopamine transporter*). Os níveis de DAT são preditivos da integridade e do número de neurônios dopaminérgicos. A redução nos níveis desse transportador no estriado acomete 95% dos pacientes com a DP (WANG *et al.*, 2013). Como pode ser observado no **Fig. 2**, pela técnica de ultrassonografia transcraniana, nota-se uma redução na marcação relativa ao DAT em pacientes portadores da DP (WANG *et al.*, 2013).

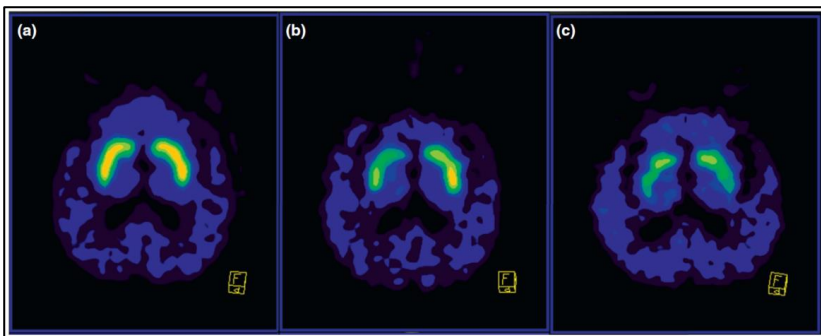


Figura 2. Imagens marcadas para DAT por sonografia transcraniana. (a) Indivíduos sem DP. (b) Paciente sem diagnóstico de DP no momento do estudo, porém o diagnóstico foi realizado posteriormente. (c) Paciente parkinsoniano com diagnóstico clínico (modificado de WANG *et al.*, 2013).

A degeneração dopaminérgica presente na DP gera um desequilíbrio na atividade entre dois circuitos estriatais (direto e indireto). Essas vias neuronais controlam a atividade de estruturas dos núcleos da base, como a substância negra parte reticulada (SNr) e o globo pálido interno (GPI). A via direta desinibe os seus alvos, os quais facilitam o movimento. Em contraste, a via indireta inibe os seus alvos, que estão envolvidos com a supressão dos movimentos. A via indireta está envolvida com projeções GABAérgicas para o globo pálido externo (GPe) e o núcleo subtalâmico (NST) (**Fig. 3**) (BEVAN, ATHERTON & BAUFRETON, 2006). Como as projeções dos neurônios das vias estriatais direta e indireta expressam preferencialmente receptores dopaminérgicos do tipo D1 (D1R) excitatórios e D2 (D2R) inibitórios, respectivamente, a modulação dopaminérgica ocorre de maneira diferenciada para a execução dos movimentos voluntários (BEVAN, ATHERTON & BAUFRETON, 2006). Na DP, em consequência da neurodegeneração dopaminérgica, a via indireta encontra-se mais ativada. Esses eventos estão relacionados com o aparecimento dos sintomas motores verificados em estágios mais avançados da doença (ALBIN, YOUNG & PENNEY, 1989; BERGMAN, WICHMANN &

DELONG, 1990). Neste contexto, a utilização de agonistas dos receptores D2 (acoplados à proteína Gi) para dopamina se torna uma ferramenta interessante para o tratamento da DP.

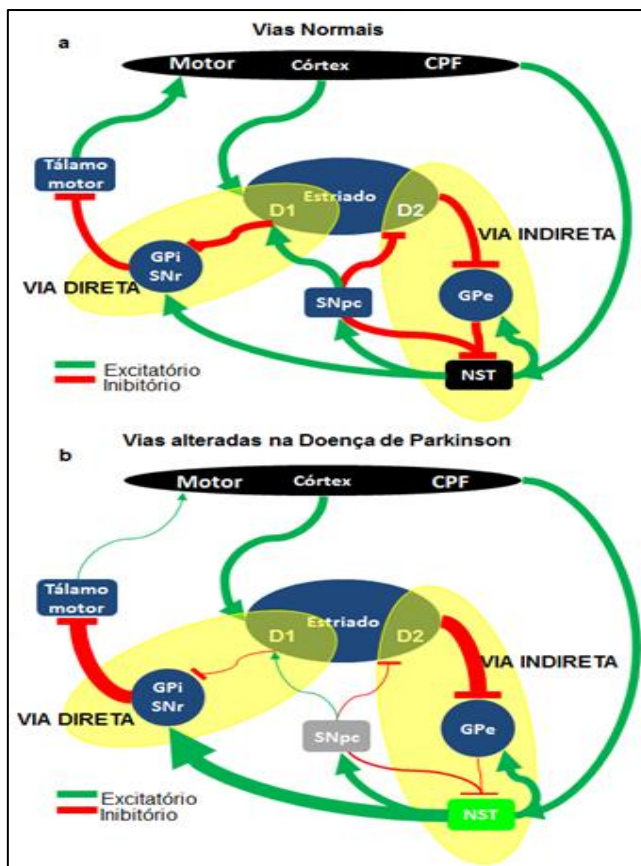


Figura 3: Vias anatômicas afetadas na doença de Parkinson. (a) representação das vias em condições normais. (b) representação das vias que se encontram alteradas na doença de Parkinson. Legenda: GPi: globo pálido interno; GPe: globo pálido externo; SNpc: substância negra parte compacta; SNr: substância negra parte reticulata; NST: núcleo subtalâmico (modificado de BERGMAN, WICHMANN & DELONG, 1990).

Classicamente, a DP é caracterizada como um transtorno do movimento. Os sintomas motores observados nessa doença são: a rigidez muscular, a bradicinesia (lentidão dos movimentos), a micrografia, o tremor em repouso e a perda do reflexo postural. Quando esses sintomas motores acometem os pacientes parkinsonianos, aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNc já se encontram degenerados e os níveis de dopamina no estriado estão depletados em 70-80% (RIEDERER & WUKETICH, 1976; BARRIO, HUANG & PHELPS, 1997). Portanto, o processo neurodegenerativo encontra-se bastante avançado quando o diagnóstico clínico é estabelecido. Jean Marie Charcot, um dos pioneiros da neurologia moderna, discordou da descrição inicial de James Parkinson quanto à preservação das funções corticais superiores na doença. Ele caracterizou nos pacientes parkinsonianos a perda da memória e outros déficits cognitivos (MENESES & TEIVE, 1996).

O conhecimento acerca da DP tem aumentado muito nos últimos anos. Nos dias atuais, já se conhecem outras disfunções e sintomas que acometem os pacientes em estágios mais precoces que precedem o surgimento dos sintomas motores. A este respeito, um grupo de patologistas alemães coordenados por Braak e colaboradores (2003) mudou a visão tradicional sobre o decurso temporal da DP: através da introdução de seis estágios que incluem os sintomas não motores, os autores ressaltaram o aparecimento dos sintomas olfatórios iniciais, passando por sintomas cognitivos (como perda de memórias operacionais) e emocionais (como depressão e ansiedade), até o aparecimento das alterações motoras clássicas. Além dos sintomas clínicos, a “hipótese de Braak” compreende ainda os processos patológicos subjacentes a cada estágio (CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006). Esses sintomas iniciais da DP são extremamente importantes para o desenvolvimento de testes que permitam o seu diagnóstico mais precoce. A expectativa é que no futuro novas abordagens terapêuticas sejam iniciadas em estágios mais precoces da DP (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; OWEN, 2004; CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006; MAETZLER, LIEPELT & BERG, 2009; MEMBER *et al.*, 2014).

Na DP, além da via nigroestriatal, outras vias dopaminérgicas como as vias mesolímbica e mesocortical também podem estar acometidas (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; BRAAK *et al.*, 2004). Estas outras vias acometidas relacionam-se com estruturas cerebrais diversas como o

CPF, o hipocampo e a amígdala. Assim, ressalta-se que a dopamina não está relacionada somente a funções motoras. Também está envolvida, por exemplo, com aspectos cognitivos e emocionais (BLIER, 2013; PUIG, ANTZOULATOS & MILLER, 2014).

Outros sistemas de neurotransmissão também são afetados pela DP. Neurônios noradrenérgicos (*locus coeruleus*) (DEL TREDICI & BRAAK, 2013), neurônios serotoninérgicos (núcleos da rafe) (TAN *et al.*, 2011) e neurônios colinérgicos (núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do vago) (BOHNEN & ALBIN, 2011), além de alterações nos sistemas GABAérgico e glutamatérgico vêm sendo descritos na DP (BRICHTA, GREENGARD & FLAJOLET, 2013). Alterações nesses sistemas de neurotransmissão estão associadas ao aparecimento dos sintomas não motores da DP, como prejuízos olfatórios, de aprendizado e memória, transtornos de humor (ansiedade e depressão), entre outros. Vale ressaltar que os sintomas não motores muitas vezes não são percebidos ou relatados pelos pacientes, cuidadores e médicos, em detrimento ao aparecimento dos sintomas motores. Esta característica é preocupante, uma vez que os sintomas não motores prejudicam a qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos (MARTINEZ-MARTIN, 2011). Além do avanço no conhecimento acerca do decurso temporal da patologia e aparecimento dos sintomas na DP, é necessário um maior entendimento de seu diagnóstico e tratamento.

1.1.3 Diagnóstico e tratamento farmacológico

Desde 1817, quando foi originalmente descrita por James Parkinson no “Ensaio sobre a paralisia agitante”, a DP vem sendo classicamente caracterizada como uma doença motora (revisado por SAMII, NUTT & RANSOM, 2004). Na monografia de James Parkinson foram descritos os sintomas motores de seis casos clínicos. No entanto, o autor fez ressalvas de que os sentidos e o intelecto destes pacientes não estavam alterados (PARKINSON, 2002). Atualmente a DP é diagnosticada clinicamente através da observação dos sintomas motores cardinais como tremores de repouso, rigidez muscular e bradicinesia (lentidão para iniciar os movimentos). Para o diagnóstico é necessário o paciente apresentar bradicinesia junto com pelo menos mais um dos sintomas motores. Além disso, a reversão desses sintomas com o tratamento com levodopa (L-Dopa) é utilizada como uma ferramenta adicional no diagnóstico da DP (BERG *et al.*, 2014). Entretanto, como descrito

anteriormente, quando os sintomas motores tornam-se evidentes, a degeneração nigroestriatal encontra-se num processo bastante avançado e irreversível (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

O tratamento farmacológico utilizado atualmente na DP tem como objetivo principal restaurar a atividade dopaminérgica no sistema nervoso central (SNC). Isso pode ser realizado através da administração do precursor da síntese de dopamina (L-dopa), agonistas dos receptores dopaminérgicos (ex: bromocriptina e pramipexol), inibidores das enzimas catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoaminoxidase B (MAO-B) que impedem a metabolização de dopamina (ex: entacapone e selegilina, respectivamente) e drogas que aumentam a liberação de dopamina e/ou inibem sua recaptação, como a amantadina (GIROUX, 2007; CONNOLLY & LANG, 2014). Apesar de não serem medicamentos que atuam diretamente sobre o sistema dopaminérgico, os antagonistas dos receptores muscarínicos para a acetilcolina (como o biperideno) aumentam a liberação de dopamina em terminais pré-sinápticos, auxiliando no restabelecimento temporário da neurotransmissão dopaminérgica (GIROUX, 2007; CONNOLLY & LANG, 2014).

Apesar do uso da L-dopa na terapia antiparkinsoniana ser muito bem sucedido desde a década de 1960, há algumas limitações ao seu emprego. Após a sua administração, grande parte da L-dopa é descarboxilada por enzimas presentes na mucosa intestinal e em outros locais periféricos, e apenas cerca de 1% da droga chega inalterada no SNC (DURSO *et al.*, 2000). Por esse motivo, o tratamento farmacológico empregado na terapia antiparkinsoniana geralmente associa a L-dopa a outros fármacos. A carbidopa ou a benserazida inibem a degradação periférica da L-dopa realizada pela enzima dopa descarboxilase. Essa associação permite reduzir a dose de L-dopa necessária para atingir a concentração terapêutica adequada (RODRIGUES & CAMPOS, 2006).

A administração da L-dopa está associada a um grande número de efeitos indesejáveis, como náuseas, vômitos e arritmia cardíaca, causados por sua degradação periférica. Efeitos importantes observados em longo prazo são o surgimento de discinesias (movimentos involuntários de contração muscular) e flutuações motoras. A indução de discinesias pode ser mais debilitante que a doença em si e faz com que muitos pacientes abandonem o tratamento com L-dopa (RASCOL *et al.*, 2000; GIROUX, 2007). As flutuações motoras inicialmente ocorrem

ao final do efeito da dose. No entanto, com o passar do tempo, essas flutuações podem ocorrer de maneira imprevisível, gerando os estados “liga e desliga” (do inglês *on/off*) (GIROUX, 2007).

Os agonistas dopaminérgicos usados como monoterapia tratam eficazmente os sintomas motores. Estudos clínicos já evidenciaram que o uso precoce dessa classe de fármacos pode reduzir ou retardar as complicações motoras observadas com o uso da L-dopa (RASCOL *et al.*, 2000; HOLLOWAY *et al.*, 2004). Dessa forma, os agonistas dopaminérgicos podem ser considerados um tratamento inicial eficaz. No entanto, eles também apresentam alguns efeitos adversos como náuseas, vômitos, sonolência, quadros de alucinação e delírio (GIROUX, 2007). A amantadina, um antagonista dos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) para glutamato, facilita a transmissão dopaminérgica no estriado, melhora os sintomas motores e reduz a severidade das discinesias. No entanto, promove um grande número de efeitos colaterais (ex: perda da libido, tonturas e confusão mental, entre outros) (METMAN *et al.*, 1999; PAHWA *et al.*, 2015).

É importante destacar que os medicamentos disponíveis atualmente são uma alternativa terapêutica meramente paliativa da DP, restabelecendo temporariamente a função dopaminérgica no SNC. Em outras palavras, esses fármacos atuais não apresentam uma ação neuroprotetora comprovada sobre o processo neurodegenerativo, que continua a progredir. Por esta razão, o tratamento farmacológico atual para o tratamento da DP apresenta uma eficácia relativa e temporária, além de estar associada a um grande número de efeitos colaterais (GIROUX, 2007; CONNOLLY & LANG, 2014). Devido a isso, outros tratamentos estão sendo investigados na tentativa de se alcançar alternativas terapêuticas mais eficazes. Dentre esses podemos citar: os antagonistas dos receptores para adenosina, antagonistas dos receptores glutamatérgicos, agonistas dos receptores para serotonina, antagonistas dos receptores adrenérgicos, bloqueadores de canais de cálcio, agonistas do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), quelantes de ferro, anti-inflamatórios, anti-oxidantes, entre outros (STAYTE & BRYCEVISSEL, 2014).

2 Capítulo 2:

Otimização do modelo experimental da DP

2.1 Introdução

2.1.1 O estriado no contexto da doença de Parkinson

Como citado no Capítulo 1, o corpo estriado é uma estrutura encefálica pertencente aos núcleos da base que classicamente está relacionada com o controle das funções motoras. Essa é a região principal de entrada dos gânglios basais, e faz ligação com o córtex cerebral (AFIFI, 1994; OBESO *et al.*, 2008). O estriado é considerado uma região com diversas funções, pois recebe projeções dos núcleos basais, além de diversas outras áreas encefálicas envolvidas com funções motoras e não motoras, como o córtex motor, o CPF, o hipocampo e o *núcleo accumbens* (DEVAN, HONG & MCDONALD, 2011; GUTHRIE *et al.*, 2013).

Nos seres humanos, o estriado é formado pelos núcleos caudado e putâmen, sendo esta a estrutura com maior degeneração na DP (OBESO *et al.*, 2008). Em roedores, o estriado pode ser subdividido em estriado ventral (*núcleo accumbens* e tubérculo olfatório) e estriado dorsal (complexo caudado-putâmen). Adicionalmente, o estriado dorsal pode ser didaticamente subdividido em estriado dorsomedial (EDM) e estriado dorsolateral (EDL), como pode ser observado na **Figura 4**. O EDL, que possui homologia com o putâmen (região mais afetada na DP) em primatas, recebe aferências de áreas motoras como a SNc. O EDL recebe também aferências do córtex somatosensorial e do CPF formando alças corticoestriatais não motoras (DEVAN, HONG & MCDONALD, 2011).

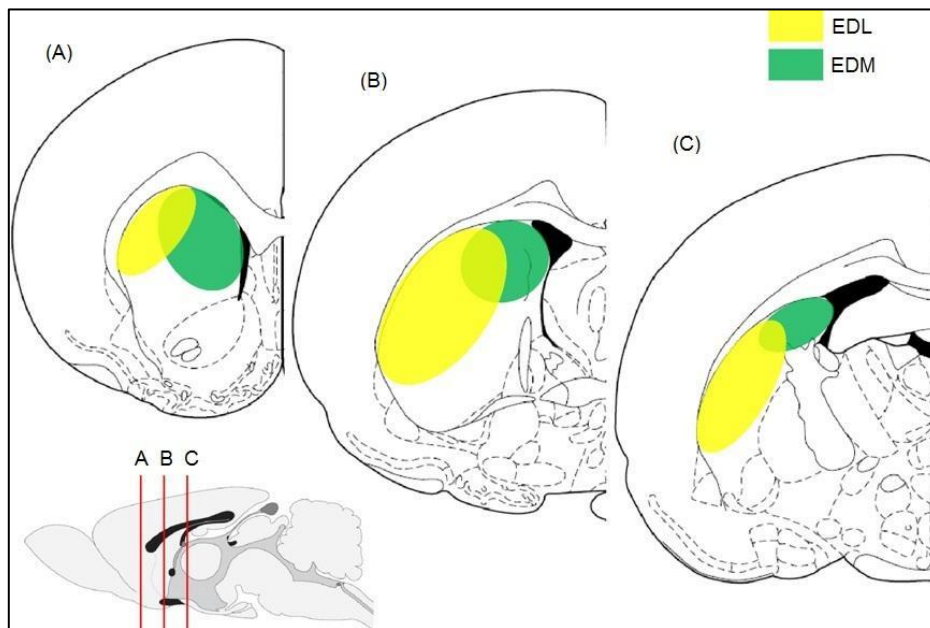


Figura 4: Representação coronal de cérebro de rato (hemisfério esquerdo) em diferentes níveis no sentido rostro-caudal (A – C). Ressalta-se a localização em nível caudal do estriado dorsolateral (EDL em amarelo) e em nível rostral do estriado dorsomedial (EDM em verde) (Modificado de DEVAN, HONG & MCDONALD, 2011).

As vias de comunicação intra-estriatais funcionam de maneira integrada. Essa estrutura encefálica parece integrar informações provenientes de outras vias como as cortico-estriatais. Um trabalho recente desenvolvido por Bell e colaboradores (2014) avaliou se a disfunção dopaminérgica observada nos pacientes parkinsonianos estaria relacionada com prejuízos de conectividade neuronal entre as diferentes sub-regiões do estriado, e se poderia interferir em sua integração das estruturas e com as vias corticoestriatais. Os resultados mostraram que ocorreram prejuízos nessa conectividade e que os mesmos estariam correlacionados com uma dissociação do estriado com as funções das vias sensoriomotoras corticais. Esses achados enfatizam o papel central da dopamina em integrar o funcionamento estriatal, bem como as consequências patológicas da desnervação dopaminérgica para outras regiões cerebrais na DP (BELL *et al.*, 2014).

Outro estudo investigou a conectividade funcional das vias cerebrais em pacientes com diagnóstico recente de DP e ainda sem a interferência do tratamento farmacológico. LUO e colaboradores (2014) observaram uma redução de conectividade nas vias mesolímbicas-estriatais e córtico-estriatais. Esses resultados sugerem que alterações na conexão neuronal entre as diferentes vias estriatais, mesolímbicas e sensoriomotoras podem estar relacionadas com alguns sintomas emocionais e cognitivos observados na DP (LUO *et al.*, 2014).

Assim, o estriado se caracteriza como uma estrutura cerebral de grande interesse para o estudo das funções motoras, cognitivas e emocionais relacionadas à DP, seja por ação direta ou por interferência com outras vias neuronais. Dessa forma, se torna imperativo um conhecimento melhor acerca dessas intercomunicações entre diferentes regiões cerebrais e os sintomas não motores da DP. Apesar do interesse crescente sobre as diversas funções do estriado, não é conhecido ainda como a DP pode alterar o funcionamento desta estrutura. Sendo assim, toxinas capazes de degenerar neurônios dopaminérgicos estriatais tornam-se ferramentas interessantes para o estudo do envolvimento do estriado na manifestação dos sintomas motores e não motores da DP.

2.1.2 6-Hidroxidopamina: uma toxina versátil para o estudo de características da doença de Parkinson

Os animais de laboratório não apresentam os sinais da DP naturalmente. Assim, existe uma grande diversidade de modelos experimentais para o melhor entendimento da DP, como os modelos baseados em toxinas e os modelos genéticos. Entre as toxinas podemos citar como as mais utilizadas o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Apesar da evolução dos modelos animais da DP nos últimos anos, a 6-OHDA continua a ser uma ferramenta experimental útil, sendo uma das toxinas mais utilizadas para induzir lesão da via nigroestriatal em roedores (para revisão ver: BLESÁ & PRZEDBORSKI, 2014).

Desde a década de 1960, a 6-OHDA vem sendo utilizada como um modelo de neurodegeneração (PORTER, TOTARO & STONE, 1963; URETSKY & IVERSEN, 1969) e também como uma ferramenta para o estudo de alterações comportamentais motoras observadas na DP (BURKARD, JALFRE & BLUM, 1969). O primeiro registro da utilização desta neurotoxina em um modelo experimental para a indução de neurodegeneração na via nigroestriatal foi feito em 1971 pelo trabalho de Ungerstedt. Este estudo pioneiro avaliou parâmetros de adipisia (incapacidade de reconhecer e atender às necessidades do organismo de absorver água) e de afagia (impossibilidade de comer) em animais com lesões extensas (UNGERSTEDT, 1971). Desde então houve uma crescente publicação de trabalhos relacionando a 6-OHDA com a via nigroestriatal e a DP (para revisão ver: BLESÁ & PRZEDBORSKI, 2014).

A 6-OHDA é captada por transportadores de dopamina e noradrenalina nos terminais neuronais, se auto-oxida e inibe a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias induzindo a morte neuronal (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008; KUPSCH *et al.*, 2014). Estas ações geram estresse oxidativo e deficiência na produção de trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) sendo estas alterações também observadas em pacientes parkinsonianos induzindo a morte neuronal (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008).

Para tornar a lesão mais seletiva para os neurônios dopaminérgicos, a desipramina é frequentemente administrada por via intraperitoneal 30 min antes da injeção estereotáxica da 6-OHDA. A desipramina é um

inibidor não seletivo dos transportadores de noradrenalina e serotonina (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008). Assim, com esses transportadores inibidos pela desipramina, a 6-OHDA será captada seletivamente por transportadores de dopamina. A neurodegeneração dopaminérgica obtida com esta toxina é mais reprodutível, em contraste com outros modelos nos quais são observadas maiores variabilidades interindividuais (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008).

A versatilidade é uma característica típica deste modelo: a partir de variações na dose e local de administração da 6-OHDA é possível a obtenção de lesões totais ou parciais da via nigroestriatal reproduzindo diferentes estágios da DP (HEUER *et al.*, 2012). Uma limitação do modelo é que a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica em condições fisiológicas normais (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008). Assim, deve ser administrada esterotaxicamente no SNC podendo ser injetada em diferentes regiões encefálicas, como a SNc, o estriado e o feixe prosencefálico medial (HEUER *et al.*, 2012), como pode ser observado no quadro 1 na página seguinte. Isso torna o modelo mais atraente para o estudo do envolvimento de diferentes regiões encefálicas na DP.

Quadro 1: Estudos da literatura que induziram alterações comportamentais pela injeção de 6-OHDA.

Espécie	Dose de 6-OHDA	Local de injeção	Perfil de Lesão	Tempo de avaliação	Prejuízo motor	Teste não motor	Referência
Ratos	12 µg	EVL	Bilateral	7 ou 21 dias	Não /Sim	Memória social, Labirinto aquático, Nado Forçado, Preferência por sacarose	Tadaiesky et al., 2008
Ratos	15 µg	EVL	Bilateral	-	Sim	Preferência por sacarose, Nado forçado, Reconhecimento do objeto	Rampersaud et al., 2012
Ratos	12,5 ug	FPM	Unilateral	42 dias	Sim	Nado forçado	Zhang et al., 2011
Ratos	3 µg	FPM	Bilateral	90 dias	Sim	Nado forçado, Labirinto em cruz elevado, Memória social	Jaunaraajs et al., 2012
Ratos	10,5 µg	FPM	Unilateral	A partir de 14 dias	Sim	Reconhecimento do objeto, Caixa claro-escuro, Labirinto em cruz elevado,	Chao et al., 2013
Ratos	12 ug	SNC	Bilateral	1, 7, 14, 21 dias	Sim	Nado forçado, Preferência por sacarose	Santiago et al., 2010
Ratos	8 µg	SNC	Unilateral	7 dias	Sim	Labirinto em Y, Labirinto radial, Nado forçado, Labirinto em cruz elevado	Foyet et al., 2011

Legenda: ED (estriado dorsal), EVL (estriado ventrolateral), FPM (feixe prosencefálico medial), SNC (substância negra parte compacta), NA (não avaliado).

Quando se pesquisou até o dia 15 de março de 2015 o termo 6-OHDA associado ao termo DP na base de dados PubMed.gov encontrou-se o somatório de 3331 trabalhos publicados, entre os anos de 1971 e 2015. Assim, fica claro que este modelo experimental tem sido amplamente utilizado para o estudo de aspectos fisiopatológicos da DP e também de abordagens terapêuticas inovadoras (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008; BLESÁ & PRZEDBORSKI, 2014).

Os trabalhos que utilizaram a 6-OHDA como ferramenta experimental para induzir lesão da via nigroestriatal avaliaram os prejuízos motores e não motores em diversos testes comportamentais. É sugerido que esta avaliação ocorra com doses diferentes de 6-OHDA em intervalos de tempo distintos (HEUER *et al.*, 2012). Também é desejável que se estabeleçam os níveis de neurodegeneração através da utilização de marcadores relacionados com o sistema dopaminérgico e também com a morte neuronal (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008; BLESÁ & PRZEDBORSKI, 2014; HEUER *et al.*, 2012).

As primeiras investigações pré-clínicas acerca da DP eram focadas no estudo dos sintomas motores e utilizavam protocolos que geravam um grau elevado de lesão unilateral da via nigroestriatal (UNGERSTEDT, 1971). Nos dias atuais, aumentou o interesse na investigação dos sintomas não motores presentes nesta patologia, como prejuízos cognitivos e emocionais. Porém, este tipo de investigação científica tem gerado resultados conflitantes. Uma das grandes limitações na interpretação de alguns resultados presentes na literatura avaliando os sintomas não motores no modelo da 6-OHDA é a ocorrência de prejuízos das funções motoras nos mesmos animais. Além disso, grande parte dos estudos utilizando a 6-OHDA induz uma lesão unilateral nos animais (hemiparkinsonismo), característica que não é observada na DP (ZHANG, EGELAND & SVENNINGSSON, 2011; CHAO, PUM & HUSTON, 2013). Dentre os trabalhos que utilizam a lesão bilateral com 6-OHDA, alguns evidenciaram comprometimento locomotor dos animais (ANDRINGA *et al.*, 2000; FOYET *et al.*, 2011). Esse cenário demonstra um perfil preocupante, pois a lesão, seja ela uni ou bilateral, causa prejuízos das funções locomotoras que irão interferir com os comportamentos não motores avaliados. Assim, espera-se que

através do uso de diferentes doses de 6-OHDA torne-se possível a observação de sinais motores e não motores relacionados à DP.

2.2 Justificativa do trabalho

Na tentativa de se compreender melhor as características da DP e buscar novos tratamentos foram desenvolvidos modelos experimentais baseados na administração de toxinas e/ou alterações em genes relacionados à DP. As informações apresentadas até aqui mostram que a DP é uma doença bastante complexa que envolve diversos fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos. Dentre esses fatores destacam-se os sintomas não motores e a existência de tratamentos farmacológicos meramente paliativos. Esse cenário demanda novos olhares e novas perspectivas, como a avaliação do envolvimento de diversas regiões encefálicas, como o estriado e o córtex pré-frontal (CPF), nos processos subjacentes à DP. Assim, o presente trabalho propõe esclarecer a dissociação de sintomas relacionados à depressão no modelo da 6-OHDA em ratos. Busca-se para tal a utilização de ferramentas comportamentais, neuroquímicas e eletrofisiológicas que auxiliem o entendimento do papel do estriado e do CPF em tais sinais.

2.3 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o efeito da toxina 6-OHDA sobre os comportamentos relacionados à depressão em ratos, bem como o envolvimento do estriado dorsolateral (EDL) e do córtex pré-frontal medial (CPFm) sobre tais comportamentos.

2.3.1 Objetivos específicos do capítulo 2

- Otimizar o protocolo de injeção intraestriatal de 6-OHDA para o estudo dos parâmetros motores e não motores da DP;
- Avaliar o perfil de degeneração do EDL e SN;
- Avaliar o efeito de diferentes doses de 6-OHDA sobre a função motora de ratos.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Animais

Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (CEUA PP00830 / 2013), e estão de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Os experimentos realizados na Universidade de Coimbra (Portugal) foram aprovados pelo Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal (ORBEA). Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando 300-350 g, com idade de 12-16 semanas no momento dos testes. Os animais foram alojados em grupos de quatro a cinco por gaiola (50 x 30 x 15 cm) sob condições padronizadas de laboratório, num ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C), livre acesso à comida e à água, e com um ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00 h).

2.4.2 Drogas

O hidrocloreto de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida numa solução de metabissulfito de sódio 0,1% em solução salina (NaCl 0,9%), a qual foi utilizada como solução controle. A seleção das doses desta toxina foi baseada em estudos piloto e trabalhos publicados na literatura (TADAIESKY *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011). O hidrocloreto de desipramina (Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 20 mg/mL e injetada no volume de 1 mL/kg de animal, totalizando a dose de 20 mg/kg. Cetamina (CEVA, Brasil) (75 mg/kg) / xilazina (CEVA, Brasil) (8 mg/kg) (TADAIESKY *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011).

2.4.3 Cirurgia estereotáxica para injeção da 6-OHDA

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com técnica asséptica. A neurotoxina 6-OHDA foi injetada bilateralmente no EDL (5, 10 ou 20 µg/hemisfério, volume de injeção de 3 µL, com taxa de infusão de 1 µL/min) durante a cirurgia com a utilização do estereotáxico (Soelting®). As coordenadas estereotáxicas definidas com base no atlas de neuroanatomia de rato de Paxinos e Watson (2009)

foram: AP: +0,2 mm, ML: \pm 3,5 mm e DV: - 4,8 mm do bregma. Para a infusão da neurotoxina utilizou-se uma seringa Hamilton de 10 μ L acoplada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), conectada a um tubo de polietileno com uma agulha de 26G em sua extremidade. Após a injeção da 6-OHDA, a agulha permaneceu no local de injeção durante 5 min, para permitir a difusão completa da toxina e evitar refluxo da mesma. Todos os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com injeção de 20 mg/kg de desipramina (Sigma-Aldrich, EUA) 30 min antes da cirurgia, a fim de proteger os terminais noradrenérgicos da toxicidade da 6-OHDA. A cirurgia estereotáxica foi realizada sob anestesia de cetamina (75 mg/kg) / xilazina (8 mg/kg). Ratos do grupo controle também foram submetidos ao mesmo protocolo, exceto pelo fato de que o veículo foi injetado no lugar da 6-OHDA. Os testes comportamentais foram realizados em grupos independentes de animais 7 ou 21 dias após a lesão com 6-OHDA. Os animais foram ortonasados por decapitação logo após os testes comportamentais para as análises bioquímicas subsequentes.

2.4.4 Testes comportamentais

2.4.4.1 *Campo aberto*

A atividade locomotora espontânea foi avaliada no teste do campo aberto, usando os métodos descritos previamente (PREDIGER *et al.*, 2008). Os ratos foram colocados individualmente no centro da arena de madeira (100 x 100 cm, chão pintado na cor cinza) e deixados ali para explorarem o campo aberto por um período de 15 min (**Fig. 5**). O parâmetro de distância total percorrida foi avaliado pelo software ANY-maze® (Stoelting, EUA). Após o final do teste e antes de iniciar o teste com o animal subsequente, a arena foi cuidadosamente limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha. O experimento foi realizado em condições de baixa luminosidade (12 lux).



Figura 5: Campo aberto no qual a locomoção espontânea dos animais foi avaliada durante 15 min. Fonte: acervo pessoal do autor.

2.4.4.2 Rotarod

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do rotarod (Insight®), utilizando um protocolo de avaliação basal (antes da cirurgia estereotáxica) no qual foram feitas com 3 tentativas com velocidade constante de 5 rpm. Os animais que permaneceram no rotarod por 1 min foram incluídos no estudo e submetidos à cirurgia estereotáxica. No dia do teste realizado 7 ou 21 dias pós-cirurgia, os ratos foram colocados sobre o cilindro mantido a uma rotação constante de 5 rpm para sua habituação durante 1 min. Após o período de habituação, iniciou-se o período de teste que consistia num protocolo de aceleração progressiva (fase 1-2: 16 rpm; fase 3-4: 20 rpm; fase 5-6: 25 rpm; fase 7-8: 28 rpm; fase 9-10: 37 rpm). O rotarod possui um indicador luminoso que mostra a evolução das fases (**Fig. 6**). A transição entre todos os estágios durou no máximo 6 min. Após o animal atingir a velocidade máxima era mantido sobre o cilindro por mais um 1 min. Assim, o tempo máximo de permanência de cada animal no cilindro foi de 7 min ou até que o mesmo caísse do cilindro. Após cada teste, o rotarod era limpo com solução de etanol 10% e seco com papel toalha. A latência para queda foi o parâmetro aferido para avaliação da coordenação motora dos animais. O experimento foi realizado em condições de baixa luminosidade (12 lux) (THOMAS TAYRA *et al.*, 2013).



Figura 6: Aparato do rotarod utilizado para avaliação da coordenação motora e equilíbrio dos animais. Fonte: Insight®.

2.4.4.3 Teste da força de preensão plantar

O teste foi realizado como descrito por Bertelli & Mira (1995). Para a avaliação da força dos membros anteriores utilizou-se um sistema automatizado (*Grip Strength Meters*, Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA) (**Fig. 7**). A medida da força foi realizada através da aferição da força máxima exercida pelas patas anteriores na grade do equipamento. Durante o teste, cada rato foi posicionado em frente à grade do equipamento (10 x 12 cm) e conduzido a segurar na mesma. Em seguida, os animais foram puxados na direção oposta ao aparelho e a força máxima foi aferida em triplicata (intervalo de 1 min entre as avaliações) para cada animal. Ambos os membros anteriores foram avaliados simultaneamente e a força exercida foi representada em gramas. O experimento foi realizado em condições de baixa luminosidade (12 lux).



Figura 7: Aparelho que afere a força de preensão plantar utilizado para avaliação da força dos membros anteriores dos animais. Fonte: Columbus Instruments®.

2.4.5 Quantificação de tirosina hidroxilase por imunoistoquímica

Os animais foram anestesiados com isoflurano e perfundidos com salina (NaCl 0.9%, VETEC®) seguido de solução de paraformaldeído 4% (VETEC®). Após a perfusão os encéfalos permaneceram em solução de sacarose 30% (VETEC®) para serem crioprottegidos durante 72 h. Os encéfalos foram congelados durante 60 s em isopentano (VETEC®) a -60 °C. As amostras congeladas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em freezer -20 °C para subsequente processamento em criostato no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II, UFSC. Os encéfalos congelados foram cortados em criostato (Leica®) e as fatias de EDL e SN (25 µm de espessura) foram acondicionadas em microtubos de plástico. As fatias foram lavadas 3 vezes (5 min cada) em PBS 0,1 M + 0.15 % Triton-X (pH 7.4; tampão de lavagem) e então pré-incubadas por 30 min com solução de peróxido de hidrogênio 1% em PBS para parar a atividade da peroxidase endógena. Para evitar reações inespecíficas, as fatias também foram incubadas em uma solução de BSA (do inglês *bovine serum albumin*) 5% em tampão de lavagem e 5% de soro de galinha durante uma hora. As fatias foram incubadas com o anticorpo primário (anticorpo

policlonal de coelho anti-TH, na diluição 1:1500, ab-112 Abcam) por 16 h a uma temperatura de 21 °C sob agitação. Em seguida, as fatias foram lavadas com o tampão de lavagem por 3 vezes durante 5 min cada e incubadas com o anticorpo secundário por 2 h (anticorpo de cabra anti-coelho, na diluição 1:2000; ab60317, Chromeo™ 546 Abcam). As fatias foram novamente lavadas com o tampão de lavagem por 3 vezes de 5 min, e então, transferidas para as lâminas e cobertas com lamínulas. Os sinais fluorescentes foram detectados utilizando um microscópio fluorescente (BioZero8000, Keyence Corp., Japão) (MATHEUS *et al.*, 2012). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II, UFSC. Para a quantificação das imagens foi utilizado o *software* Image J® obtido no endereço eletrônico <http://imagej.nih.gov/ij/>. No EDL a quantificação foi realizada através da densidade ótica. Na SN foi realizada a contagem dos corpos celulares marcados, sendo que para cada animal a quantificação foi feita em ambas as estruturas em fatias representativas de diversos níveis ao longo do eixo rostro-caudal da região cerebral em questão.

2.4.6 Coloração de Fluoro Jade B

O Fluoro-Jade B (FJB) é um derivado aniônico da fluoresceína que é amplamente utilizado para a coloração histológica de neurônios em processo de degeneração (SCHMUED & HOPKINS, 2000). As fatias de EDL e SN foram cortadas em criostato a 25 µm e foram colocadas em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram reidratados por exposição sequencial a etanol 100% durante 3 min em, seguido por 2 min em etanol 70% e 2 min em água destilada. Após estes banhos sucessivos, as fatias foram incubadas com permanganato de potássio 0,06% (Merck Millipore, Alemanha) em água destilada durante 15 min, seguido por 3 lavagens com água destilada durante 2 min cada. Após este período, as amostras foram protegidas da luz e incubadas com solução de FJB 0,01% (Merck Millipore, Alemanha) em ácido acético a 0,1% (Merck Millipore, Alemanha) durante 30 min no escuro. Após a lavagem com água destilada, as fatias foram montadas sob lamínulas de vidro, tal como descrito anteriormente (GAO *et al.*, 2014). As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II, UFSC Para a quantificação das imagens por densidade óptica foi utilizado o *software* Image J®.

2.4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. As variáveis independentes utilizadas foram o tratamento (veículo ou diferentes doses de 6-OHDA) e o tempo (7 ou 21 dias). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância aceito como indicativo de diferença entre os grupos foi $P < 0.05$. Todas as análises foram realizadas com o *software* Statistica 7®. Todos os gráficos contidos nessa tese foram obtidos com a utilização do *software* GraphPad Prism 5®.

2.4.8 Protocolo experimental

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica bilateral para a injeção de 6-OHDA no EDL (**Fig. 8**). Após 7 ou 21 dias da cirurgia, grupos independentes de animais foram avaliados nos testes do campo aberto, do rotarod e da força de preensão plantar, sendo que nenhum animal foi utilizado em mais de um teste comportamental. Os ratos foram então ortinasiados e os cérebros removidos para a realização da quantificação imunoistoquímica da TH, um marcador da inervação dopaminérgica, no EDL e na substância negra (SN). Também foi realizada a coloração de FJB para a marcação de neurônios em processo de degeneração no EDL e na SN.

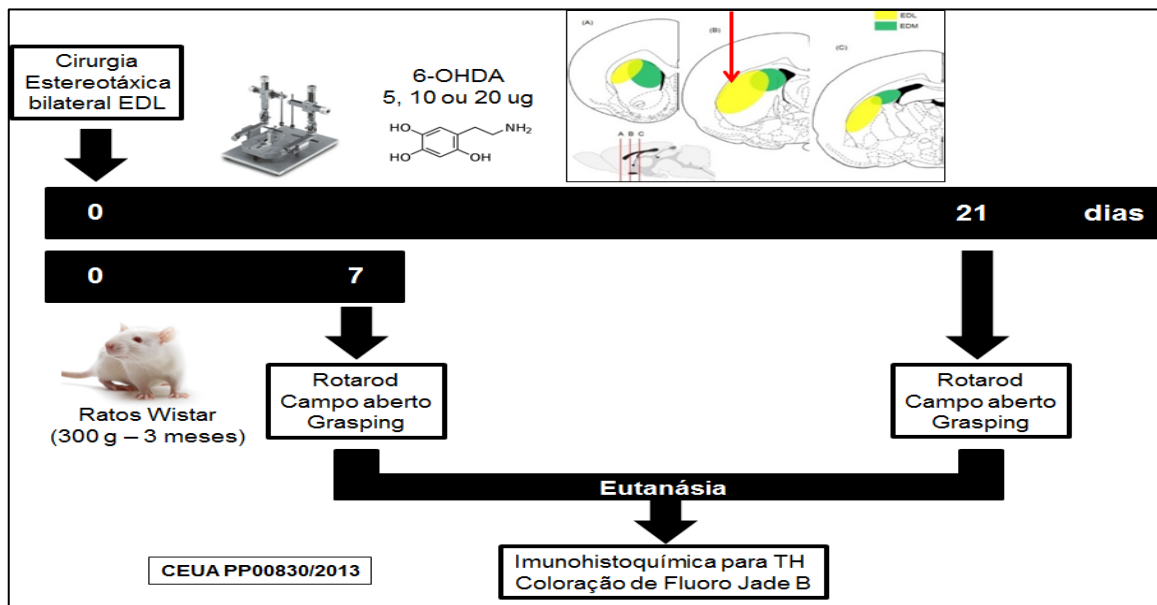


Figura 8: Primeiro protocolo experimental. Ratos Wistar machos com 3 meses de idade foram submetidos a cirurgia estereotáxica bilateral para a injeção de 6-OHDA nas doses de 5, 10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{sítio}$ no EDL. Após 7 ou 21 dias, grupos independentes de animais foram avaliados nos testes comportamentais do campo aberto, rotarod e preensão plantar para a avaliação da função motora. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados e os cérebros recolhidos para as análises histológicas.

2.5 Resultados

2.5.1 Padronização do protocolo de injeção de 6-OHDA intra-estriatal: definição de dose

Para a padronização da dose de 6-OHDA a ser utilizada nas etapas subsequentes do estudo foram realizados a quantificação da lesão na via nigroestriatal e os testes comportamentais de triagem para as funções motoras. A administração intra-estriatal de 6-OHDA causou uma lesão retrógrada da via dopaminérgica nigroestriatal (**Figs. 9 e 10**). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator tratamento em ambos os tempos avaliados. O número de células TH-positivas foi reduzido nos grupos injetados com 6-OHDA quando comparado ao grupo controle no EDL (7 dias: $63,0 \pm 2,5$ %, 21 dias: $65,6 \pm 1,8$ %, $F_{(3, 40)}=164,55$, $P < 0,05$) (**Fig. 9A, B**). Não houve diferenças significativas para o fator tempo no EDL ($F_{(1, 40)}=2,52$, $P > 0,05$).

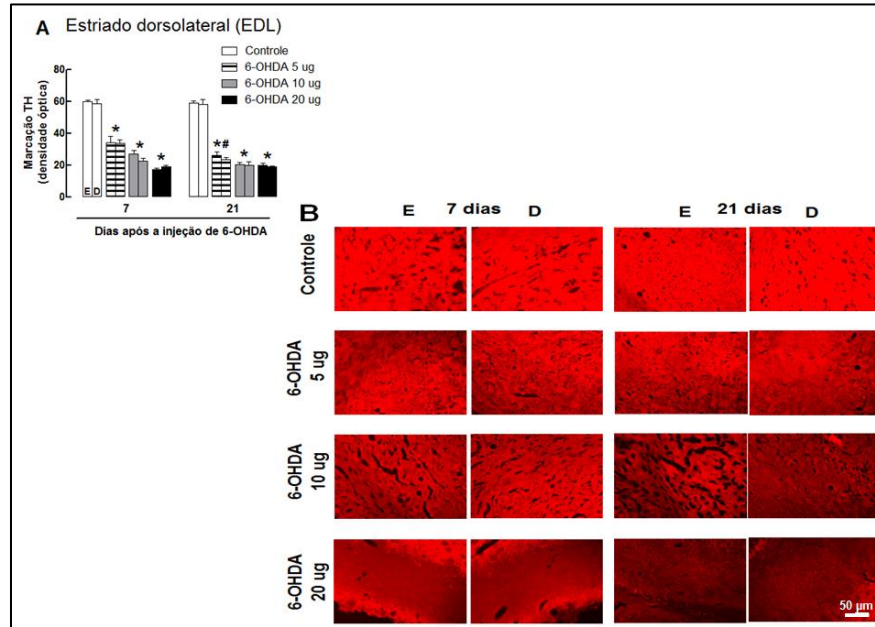


Figura 9: Influência de diferentes doses de 6-OHDA na imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) no estriado dorso-lateral (A) quantificação por densitometria óptica no EDL esquerdo (E) e direito (D), (B) imagens representativas do EDL esquerdo e direito, (EDL). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls) ($n = 6$ /grupo).

O número de células TH-positivas foi reduzido nos grupos injetados com 6-OHDA quando comparado ao grupo controle na SN (7 dias: $50,0 \pm 4,5$ %, 21 dias: $68,0 \pm 4,4$ %, $F_{(3, 40)}=33,91$, $P < 0,05$) (**Fig. 10A,B**). Houve significância estatística para o fator tempo na SN ($F_{(1, 40)}=21,09$, $P < 0,05$). A interação entre os fatores tratamento e tempo foi significativa na SN ($F_{(3, 40)}=3,01$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou uma progressão da lesão ao longo do tempo na SN (**Fig. 10B**).

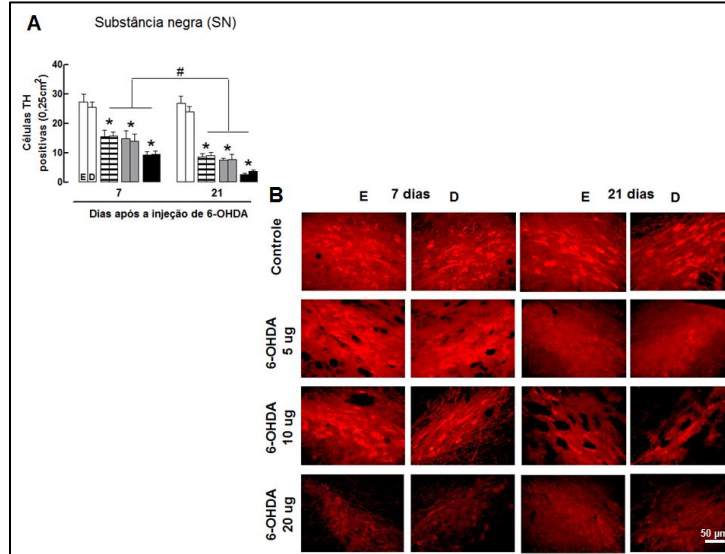


Figura 10: Influência de diferentes doses de 6-OHDA na imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra (SN) de ratos. (A) quantificação do número de células TH positivas na SN esquerda e direita ($0,25\text{cm}^2$), (B) imagens representativas da SN esquerda e direita. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. # $P < 0.05$ comparado ao respectivo grupo no tempo de 7 dias (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls) ($n = 6$ /grupo).

As imagens representativas da coloração de FJB demonstraram uma marcação em pontos verdes que é indicativa de neurônios em degeneração. Esse perfil pode ser observado aos 7 dias no EDL e aos 7 e 21 dias na SN (**Fig. 11**).

No EDL, a análise estatística revelou efeito para o fator tratamento ($F_{(3, 16)}=256,23$, $P < 0.05$), tempo ($F_{(1, 16)}=490,54$, $P < 0,05$) e para a interação entre ambos os fatores ($F_{(3, 16)}=220,19$, $P < 0,05$). Na SN, a ANOVA de duas vias também revelou efeito para os fatores tratamento ($F_{(3, 16)}=1312,7$, $P < 0,05$), tempo ($F_{(1, 16)}=42,85$, $P < 0,05$) e interação entre ambos ($F_{(3, 16)}=39,52$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a injeção de 6-OHDA aumentou a marcação para FJB (**Fig. 11C**) aos 7 dias no EDL (**Fig. 11A**) e aos 7 e 21 dias na SN (**Fig. 11B**).

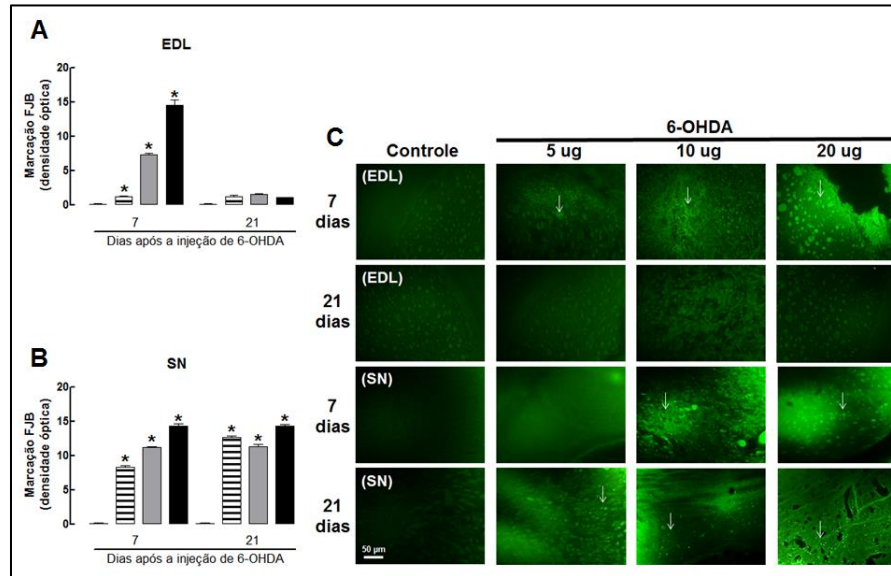


Figura 11: Influência de diferentes doses de 6-OHDA na coloração de Fluoro-Jade B (FJB) no estriado dorso-lateral (EDL) e na substância negra (SN) de ratos. Setas brancas indicam a marcação verde do FJB. (A) quantificação para as imagens representativas da coloração de FJB no EDL (B) quantificação para a coloração de FJB na SN. (C) imagens representativas do EDL e da SN para a coloração de FJB. $*P < 0.05$ comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls) (n= 6 /grupo).

Após a caracterização da lesão dopaminérgica na via nigroestriatal, foram realizados os experimentos comportamentais para avaliação da função motora. A ANOVA de duas vias revelou efeito do fator tratamento nos parâmetros avaliados nos testes do campo aberto ($F_{(3, 56)}=5,68$, $P<0,05$) e do rotarod ($F_{(3, 66)}=9,69$, $P<0,05$), mas não foi observado efeito do fator tempo (campo aberto: $F_{(1, 56)}=0,013$; rotarod: $F_{(1, 66)}=0,770$, $P>0,05$). Também não houve interação entre os fatores tratamento e tempo (campo aberto: $F_{(3, 56)}=0,38$; rotarod: $F_{(3, 66)}=0,14$, $P>0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que a dose de 20 $\mu\text{g/sítio}$ de 6-OHDA gerou prejuízos nos parâmetros motores avaliados nos testes do campo aberto (**Fig. 12A**) e rotarod (**Fig. 12B**) tanto aos 7 quanto aos 21 dias após a injeção da toxina no EDL. Não foram observados efeitos significativos no teste da força de preensão plantar (tratamento: $F_{(3, 56)}=2,58$; tempo: $F_{(1, 56)}=0,18$; interação: $F_{(3, 56)}=0,49$, $P>0,05$). As doses de 5 e 10 μg de 6-OHDA não alteraram os parâmetros motores avaliados nos diferentes testes (**Fig. 12C**).

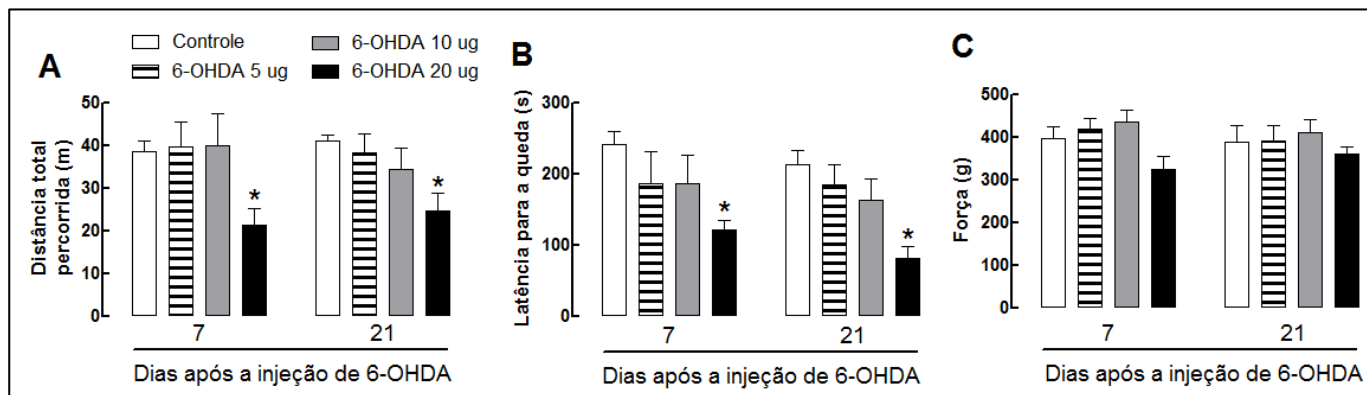


Figura 12: Efeito da injeção de diferentes doses de 6-OHDA sobre parâmetros motores de ratos avaliados nos testes do campo aberto, rotarod e força de preensão plantar. (a) Distância total percorrida (em metros) no teste do campo aberto, (b) Latência para a queda (em segundos) num protocolo de aceleração crescente no teste do rotarod, (c) Força dos membros anteriores aferida no teste da força de preensão plantar. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias seguida *post-hoc* de Newman-Keuls) ($n = 8-10$ /grupo).

2.6 Discussão

O presente protocolo experimental utilizou ratos Wistar machos com 3 meses de idade, pois este é o período ideal para o uso de ratos com relação a mortalidade e a sensibilidade à toxina (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008). A injeção da maior dose da neurotoxina foi capaz de diminuir a distância total percorrida no teste do campo aberto e a latência para a queda no teste rotarod 7 e 21 dias após a lesão. No entanto, a análise estatística não evidenciou efeito do fator tempo, corroborando achados recentes de Tayra *et al.* (2013).

Diversos trabalhos já investigaram o efeito da 6-OHDA em testes motores e mostraram que a lesão unilateral da via nigroestriatal é capaz de prejudicar o desempenho dos animais nos referidos testes. Os resultados do presente estudo mostram que o aparecimento dos prejuízos motores após a administração intra-estriatal bilateral de 6-OHDA depende da dose utilizada. Ryu *et al.* (2013) demonstraram que a lesão unilateral da via nigroestriatal diminuiu a latência para a queda no rotarod 14 dias após a indução da lesão. Outro estudo evidenciou que a 6-OHDA unilateral foi capaz de prejudicar o desempenho de ratos no rotarod 1, 7 e 14 dias após a injeção da toxina (KUMAR *et al.*, 2012). No entanto, nesses estudos prévios não foi avaliado o nível de lesão induzido pela 6-OHDA e, tampouco, se os neurônios estavam em processo de degeneração. A grande maioria dos estudos utiliza uma lesão unilateral com 6-OHDA para a avaliação das funções motoras. Porém, a avaliação *post mortem* de pacientes portadores da DP indica que a via nigroestriatal está degenerada em níveis similares em ambos os hemisférios cerebrais (MEISSNER, 2012). Assim, é imprescindível investigar o nível de lesão bilateral da via nigroestriatal e os prejuízos motores relacionados para uma caracterização mais completa do modelo da 6-OHDA.

A imunofluorescência para TH no EDL e na SN demonstrou que a injeção bilateral de 6-OHDA foi capaz de reduzir a marcação para a enzima TH em níveis similares em ambos os hemisférios cerebrais, tanto no EDL quanto na SN. O tratamento com 6-OHDA reduziu a presença de TH em ambas regiões avaliadas. Estes resultados mostram que a lesão induzida por 6-OHDA continua a progredir nos períodos de tempo avaliados (3 semanas). Em consequência desta progressão na degeneração dopaminérgica, torna-se importante a avaliação comportamental em diferentes tempos.

A injeção intra-estriatal de 6-OHDA aumentou a marcação para o FJB. Esse resultado é indicativo de que os neurônios dessas regiões encefálicas estão em processo de degeneração. Na região da injeção da toxina (EDL) a marcação para o FJB foi observada somente após 7 dias. No entanto, na SN essa marcação foi observada 7 e 21 dias após a lesão com 6-OHDA. Esse perfil corrobora os resultados obtidos na quantificação para TH. Observa-se que na SN os neurônios continuam a degenerar conforme a progressão do protocolo experimental. Outros trabalhos da literatura também evidenciaram a marcação para FJB no modelo experimental da 6-OHDA. No entanto, estes estudos não avaliaram os sintomas não motores da DP (MUÑOZ *et al.*, 2004; SILVA-ADAYA *et al.*, 2011).

A injeção de 6-OHDA em diferentes doses gerou perfis distintos de redução da marcação para a TH tanto no EDL quanto na SN. A dose de 5 µg induziu uma lesão de 40% tanto no EDL quanto na SN após sete dias de protocolo experimental. Aos 21 dias, essa lesão aumentou para 64 e 78%, respectivamente. Quando se observa o perfil de degeneração para a dose de 10 µg, percebe-se que esta induziu 59, 42% e 67, 78% de redução da TH no EDL e na SN, respectivamente aos 7 e aos 21 dias. É importante lembrar que essas doses de 6-OHDA não induziram alterações locomotoras. Já a maior dose de 6-OHDA testada (20 µg) induziu prejuízos comportamentais motores e a maior degeneração com os valores de 72% no EDL e 78% na SN após 7 dias. Vinte e um dias após a indução da lesão, a maior dose da toxina gerou uma redução de 70% no EDL e de 90% na SN para a marcação de TH. Dessa maneira, mostra-se que a degeneração na SN apresenta um caráter progressivo.

A via nigroestriatal apresenta mecanismos compensatórios para a manutenção das funções motoras mesmo em níveis parciais de degeneração, como, por exemplo, aqueles causados pelas doses de 5 e 10 µg de 6-OHDA. A maior dose de 6-OHDA foi a única que induziu um perfil de degeneração acima dos 80%. Deve ser destacado que os pacientes exibem os sintomas motores somente quando a degeneração dos terminais nervosos da via nigroestriatal encontra-se entre 70-80% e na SN a degeneração dopaminérgica esteja acima dos 60% (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Estima-se que a degeneração deva ser maior que 80% na SN para a observação de prejuízos motores nos modelos

animais da DP (HEUER *et al.*, 2012) o que está de acordo com os nossos resultados.

Alguns mecanismos responsáveis por essa compensação são: as propriedades intrínsecas dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, a plasticidade neuronal, a transmissão em volume da dopamina estriatal e as aferências da SNc (BEZARD & GROSS, 1998). As propriedades intrínsecas que mantêm o suprimento adequado de dopamina são: vias dopaminérgicas colaterais, liberação somatodendrítica de dopamina e *feedback* negativo sobre os neurônios GABAérgicos estriatais que compensam a degeneração em curso. Outro mecanismo compensatório é a regulação pré-sináptica sobre a liberação de dopamina realizada por outras substâncias como acetilcolina, serotonina, glutamato e a substância P (BEZARD & GROSS, 1998). Além desses mecanismos, também pode ser citado que a diminuição da recaptação e da metabolização de dopamina se caracteriza como alternativa para a manutenção da transmissão dopaminérgica e, conseqüentemente, das funções motoras. Também pode ocorrer um aumento de curta duração na sensibilidade pós-sináptica dos receptores para a dopamina, bem como na quantidade dos mesmos (BEZARD & GROSS, 1998). Dessa maneira, esses mecanismos podem explicar o que ocorre no nosso protocolo experimental. As doses mais baixas de 6-OHDA induziram lesão, mas não causaram prejuízos motores. Já a dose de 20 µg induziu nível de degeneração dopaminérgica acima de 80% o que se sobrepôs à capacidade do sistema motor de se adaptar.

2.7 Conclusões

Deve ser ressaltado que todas as doses testadas promoveram degeneração parcial da via dopaminérgica nigroestriatal. A maior dose induziu prejuízos de funções motoras que foram consistentes nos períodos de tempo avaliados, dado este em concordância com a literatura. Assim, o modelo experimental em questão conseguiu replicar características observadas na DP como a degeneração progressiva da via nigroestriatal e os prejuízos motores associados. É importante ressaltar que as doses de 5 e 10 µg/sítio de 6-OHDA não induziram alterações motoras. Por esta razão, estas doses foram selecionadas para as análises comportamentais nos experimentos subsequentes, avaliando os sintomas relacionados à anedonia e à depressão na DP.

3 Capítulo 3

Dissociando anedonia de outros sinais de depressão no modelo experimental da 6-OHDA em ratos

3.1 Introdução

Desde os trabalhos de Braak et al. (2003) e de Chaudhuri, Healy e Schapira (2006) os prejuízos não motores na DP vêm despertando interesse crescente de médicos e pesquisadores. Esses sintomas são tão ou mais incapacitantes que os sintomas motores para os portadores da DP. No entanto, na maioria das vezes, os prejuízos não motores são acobertados pelos sintomas motores, que são mais evidentes. Esta “invisibilidade” dos sintomas não motores pode ser devido à falta de questionamentos médicos ou pela ausência de queixas dos pacientes (BONNET *et al.*, 2012; QUELHAS, 2013). A incidência destas alterações comportamentais não motoras está presente desde os estágios mais precoces, permeando todo o transcurso da DP (BONNET *et al.*, 2012).

Um estudo apontou que os sintomas não motores relacionados à depressão, à ansiedade e aos prejuízos cognitivos são os que mais afetam a qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos (MARTINEZ-MARTIN, 2011). É imprescindível que os fatores que afetam a qualidade de vida dos pacientes sejam identificados e seus mecanismos compreendidos. Porém, as escalas de diagnóstico destes prejuízos, como aquelas incluídas no Manual de Transtornos Mentais 2013 (DSM, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* versão 5), ainda precisam ser validadas para os pacientes parkinsonianos (MARTINEZ-MARTIN, 2011).

Desde o seu desenvolvimento na década de 1960, a L-Dopa representa o tratamento farmacológico mais eficaz no alívio dos sintomas motores da DP. No entanto, os prejuízos na cognição e emoção (anedonia, depressão e ansiedade), entre outros causados pela doença, são pouco responsivos a esse tratamento (ESKOW JAUNARAJIS *et al.*, 2011).

3.1.1 Depressão: a principal comorbidade na doença de Parkinson

Teorias relacionadas com a etiologia dos sintomas depressivos na DP argumentam que a depressão seria um processo "reativo" e secundário ao estresse psicossocial que é associado a uma doença crônica (ALTHAUS et al., 2008). A depressão também poderia ser resultado de alterações neuroanatômicas que ocorrem devido à

neurodegeneração subjacente à DP (MCDONALD, RICHARD & DELONG, 2003; OSSOWSKA & LORENC-KOCI, 2013). Apesar da alta prevalência de depressão em pacientes com a DP que é de 40 a 50%, esta condição é muitas vezes subdiagnosticada e subtratada (MARTINEZ-MARTIN, 2011). Os transtornos depressivos mais observados na DP são: o transtorno de depressão maior, o transtorno depressivo de curta duração, o transtorno distímico e o episódio depressivo com sintomas insuficientes. Na prática clínica, os mesmos parâmetros estabelecidos para o diagnóstico e tratamento de transtornos de humor não associados à DP são seguidos para os pacientes com a DP (OSSOWSKA & LORENC-KOCI, 2013; STARKSTEIN, BROCKMAN & HAYHOW, 2012).

Com relação aos sintomas depressivos, a combinação de apatia, anedonia e alterações no lobo frontal do cérebro podem contribuir para o diagnóstico da depressão na DP. A hipótese de que a apatia e a depressão são de fato dois sintomas não motores independentes na DP foi apoiada recentemente (ERRO et al., 2015). No entanto, ainda existem controvérsias sobre a dissociação entre a anedonia e a depressão na DP.

3.1.2 A neurobiologia da depressão na doença de Parkinson

A depressão tem sido relacionada como o fator mais prejudicial para a qualidade de vida dos pacientes com DP na Europa (HOBSON, HOLDEN & MEARA, 1999; KARLSEN *et al.*, 1999; SCHRAG, 2006), no Brasil (CAROD-ARTAL *et al.*, 2008), na Índia (BEHARI, SRIVASTAVA & PANDEY, 2005) e em outros países (MARTINEZ-MARTIN, 2011). A etiologia da depressão na DP é complexa e pode resultar de alterações de diferentes sistemas de neurotransmissão tais como o dopaminérgico, o noradrenérgico e o serotoninérgico, causadas pelo processo neurodegenerativo (MAYEUX, 1990; SAGNA, GALLO & PONTONE, 2014).

Além disso, postula-se que a fisiopatologia subjacente à depressão na DP pode ser diferente dos mecanismos que são responsáveis pelos sintomas depressivos observados na população em geral (LIEBERMAN, 2006). Alguns estudos relataram que o processo degenerativo associado à DP estaria relacionado ao envolvimento do estriado, do córtex frontal e do sistema límbico, com alterações nas vias

neurais dopaminérgica, colinérgica, serotoninérgica, noradrenérgica e GABAérgica (BLANDINI *et al.*, 2000; FRISINA, HAROUTUNIAN & LIBOW, 2009; GUTTMAN *et al.*, 2007; SCHRAG, 2004; VRIEND *et al.*, 2014).

3.1.3 Manifestações clínicas da depressão na doença de Parkinson

As manifestações clínicas da depressão na DP podem se diferenciar das características da depressão maior e incluem irritabilidade, disforia (mudança repentina e transitória do estado de ânimo), pessimismo, concentração prejudicada, sentimento de culpa e tristeza. Além disso, pacientes parkinsonianos deprimidos exibem um menor risco de suicídio, apesar de apresentarem altos índices de ideias de morte ou suicidas (EHRT *et al.*, 2006; LEMKE, 2008; NAZEM *et al.*, 2008; SLAUGHTER *et al.*, 2001).

Pacientes com história prévia de depressão têm sintomas depressivos mais graves associados à DP (FARABAUGH *et al.*, 2009). O risco de desenvolvimento de depressão é maior em mulheres, em indivíduos com idade entre 40-69 anos, em pacientes tratados com L-DOPA por longos períodos de tempo e em pacientes com a função cognitiva prejudicada (BECKER *et al.*, 2011; TANDBERG *et al.*, 1997).

Um estudo mostrou que pacientes com DP deprimidos apresentaram prejuízos na exibição do efeito euforizante induzido pela injeção intravenosa de metilfenidato, quando comparados com pacientes com depressão sem DP (CANTELLO *et al.*, 1989). Este resultado corrobora a proposta de que danos permanentes na neurotransmissão dopaminérgica estariam associados à depressão na DP (CANTELLO *et al.*, 1989). A perda de energia e interesse, a anedonia (diminuição ou incapacidade de sentir prazer), a dificuldade de tomar decisões, os sentimentos de tristeza e desamparo e a falta de sono também são sintomas comuns em pacientes com DP deprimidos (BROWN & MACCARTHY, 1990; FARABAUGH *et al.*, 2009; LEENTJENS *et al.*, 2003a; MAYEUX *et al.*, 1986). O isolamento social é outra característica que está presente em pacientes com DP (SCHRAG 2006) e em alguns casos de depressão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Embora os sintomas da depressão na DP podem ser consequência do impacto social causado pela deficiência motora, existem cada vez mais evidências de uma relação entre a fisiopatologia da DP e a depressão. Alguns estudos mostraram que a depressão precede o aparecimento dos sintomas motores (LEENTJENS *et al.*, 2003b; NILSSON, KESSING & BOLWIG, 2001; SHIBA *et al.*, 2000). Diversos tratamentos farmacológicos direcionados ao restabelecimento da neurotransmissão dopaminérgica melhoram os prejuízos motores na DP como citado no Capítulo 1. No entanto, esse perfil não prediz uma melhora nos sintomas da depressão (CHOI *et al.*, 2000). Por outro lado, alguns estudos evidenciaram uma associação significativa entre os sintomas depressivos e escores mais graves em escalas de avaliação de sintomas motores para a DP (NÈGRE-PAGÈS *et al.*, 2010).

Apesar da depressão ser uma condição bastante associada à DP, não existem alternativas terapêuticas padronizadas e diferenciadas para o tratamento desse transtorno nos pacientes portadores da DP. Os antidepressivos são prescritos com base na minimização dos possíveis efeitos adversos que podem acometer os pacientes parkinsonianos, os quais, em sua grande maioria, são pacientes idosos e polimedicados. Além disso, alguns trabalhos de revisão e meta-análise discutem sobre a eficácia e segurança de diferentes fármacos antidepressivos para esses pacientes. Um tratamento que parece interessante é o pramipexol, um agonista dos receptores D2 para a dopamina que mostrou efeitos antidepressivos em pacientes portadores da DP em um estudo clínico randomizado, duplo-cego e com controle placebo (BARONE *et al.*, 2010). Outro estudo verificou que o pramipexol apresentou eficácia maior do que a sertralina em pacientes parkinsonianos (BARONE *et al.*, 2006).

A depressão em pacientes parkinsonianos possui sintomatologia e responsividade ao tratamento farmacológico bastante heterogêneas (QUELHAS, 2013). Os sintomas depressivos podem variar em intensidade e também podem ser dissociados ao longo do tempo durante a progressão da DP (CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006; GARCIA-RUIZ, CHAUDHURI & MARTINEZ-MARTIN, 2014). Dessa maneira, o envolvimento do sistema dopaminérgico na neurobiologia da depressão na DP é bastante reforçado. Estes resultados indicam um provável substrato neurobiológico para a depressão na DP que merece ser investigado em modelos experimentais.

3.1.4 A utilização da 6-OHDA na investigação de sintomas relacionados à depressão na doença de Parkinson: estudos pré-clínicos

Trabalhos pré-clínicos mais recentes têm demonstrado que os modelos clássicos da DP baseados em toxinas são capazes de induzir prejuízos comportamentais em diversas tarefas que avaliam funções cognitivas e de emocionalidade (LITTELJOHN *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2010; PANKOVA *et al.*, 2004; SANTIAGO *et al.*, 2010; TADAIESKY *et al.*, 2008). Os trabalhos realizados até o momento utilizaram lesão unilateral ou bilateral com doses de 6-OHDA que variaram de 3 a 30 µg por local de injeção. As regiões dos núcleos da base que foram estudadas incluem o estriado dorsal, o estriado ventral, o feixe prosencefálico medial e a SNc. Além disso, existem grandes variações nos períodos de tempo para a avaliação comportamental, variando entre 1 a 90 dias após a injeção da 6-OHDA. Os prejuízos comportamentais observados foram diversificados, incluindo comportamentos relacionados à anedonia observados no teste de preferência por sacarose e comportamentos relacionados à depressão nos testes do nado forçado e da suspensão pela cauda. Além de prejuízos em memórias de curto-prazo, operacionais e de procedimento avaliados em diferentes tarefas comportamentais, como pôde ser observado no quadro 1 apresentado no capítulo 2.

A grande maioria dos trabalhos investigaram comportamentos relacionados à anedonia ou à depressão através dos testes de consumo de sacarose, suspensão pela cauda ou do nado forçado. No entanto, é importante ressaltar que cada teste avalia comportamentos diferentes e que estes podem estar relacionados a substratos neurais distintos. Considerando que comportamentos diferentes são avaliados nestes testes, torna-se interessante a busca de uma dissociação entre sintomas como a anedonia, desamparo e isolamento social em modelos animais da DP. Por outro lado, é importante salientar a limitação dos testes comportamentais com relação à transposição do que acontece na bancada para o que é observado na clínica.

3.1.5 Anedonia na doença de Parkinson

A anedonia pode ser definida como a diminuição na capacidade de sentir prazer e também como a falta de reatividade a estímulos

prazerosos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Sua ocorrência parece ser variável em intensidade e duração, dependendo do subtipo de transtorno psiquiátrico que afeta os pacientes (BENAZZI, 2006). A prevalência da anedonia na DP varia entre 5 e 45% (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012). Essa variabilidade ocorre devido aos diferentes perfis (idade, gênero, etnia, etc) de indivíduos utilizados nos estudos clínicos.

Além da depressão, a anedonia pode estar associada com a esquizofrenia e também pode ser um fator determinante em pessoas predispostas a estes dois transtornos psiquiátricos (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012). A anedonia pode antever a ocorrência de depressão com antecedência de dois anos (WARDENAAR *et al.*, 2012), o que é um prognóstico ruim em indivíduos tratados com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) (MCMAKIN *et al.*, 2012) e um curso crônico da depressão (MOOS & CRONKITE, 1999). Estudos clínicos sugerem que pacientes parkinsonianos com anedonia podem apresentar também sintomas motores e não motores mais graves que pacientes não anedônicos (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012; PIZZAGALLI, 2014).

A anedonia pode se apresentar como estado ou apenas traço de anedonia. O primeiro se refere ao sintoma anedonia, presente em diversos transtornos psiquiátricos com um decurso similar a esses. O segundo é o déficit hedônico que se manifesta em estágios anteriores ao transtorno psiquiátrico e que permanece estável mesmo com a remissão do transtorno (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012). A anedonia pode ser ainda classificada em consumatória ou antecipatória. A forma consumatória está relacionada ao prazer do momento, o sentimento enquanto se está realizando o ato. Já a forma antecipatória envolve o prazer relacionado a experiências que serão vividas no futuro (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012). No entanto, o cenário parece ser mais complexo do que essa classificação. Diversos tipos de anedonia já foram descritos, como a anedonia sensorial e a anedonia social ou interpessoal. Além disso, essa divisão parece não considerar a existência de diferentes bases neurobiológicas para os diferentes tipos de anedonia (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012).

A anedonia pode ser considerada como um transtorno do humor específico relacionado com alterações no sistema dopaminérgico de

recompensa, que é subjacente ao processo degenerativo observado na DP (LEE & JEON, 2014; PETTORRUSO *et al.*, 2014). Apesar de diversos trabalhos já terem investigado o envolvimento de vias neurais em sintomas da depressão, este é um cenário complexo que permanece pouco compreendido. Já foram relatadas alterações neuronais em regiões estriatais ventrais e dorsais, regiões corticais (córtices orbitofrontal e pré-frontal), hipocampus e amígdalas. A dopamina parece estar envolvida com essas modificações de atividade neuronal durante a anedonia sendo relatadas alterações em seus receptores ou transportadores (PIZZAGALLI, 2014). Além disso, o tratamento da anedonia nos pacientes parkinsonianos pode trazer complicações relacionadas com uma hipersexualidade e uma impulsividade para jogos de azar, comportamentos sabidamente relacionados ao aumento da neurotransmissão dopaminérgica na via mesolímbica (LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012). Dessa maneira, é fundamental para o tratamento adequado dos pacientes parkinsonianos um conhecimento maior sobre os possíveis mecanismos neurobiológicos subjacentes a estes sintomas.

A anedonia caracteriza-se como um déficit hedônico que pode ser avaliado em modelos pré-clínicos. Através da diminuição do consumo de uma solução adocicada no teste de preferência por sacarose ou do comportamento de autolimpeza no teste do “*splash*” podem ser inferidos possíveis mecanismos neurobiológicos envolvidos com a anedonia e a depressão (ISINGRINI *et al.*, 2010; OVERSTREET, 2012).

Como já citado anteriormente, a degeneração dopaminérgica do EDL é uma característica neuropatológica importante da DP. Essa degeneração também afeta outras estruturas do cérebro, como o CPF (KEHAGIA, BARKER & ROBBINS, 2010). A conectividade entre os sistemas neuronais corticais e estriatais desempenha um papel crucial nas funções sensorial, emocional e motora (RIEGER *et al.*, 2008; SYED *et al.*, 2011; TOPS *et al.*, 2014). No entanto, a neurobiologia da anedonia e da depressão na DP ainda é pouco compreendida e o possível envolvimento dissociado do EDL e CPF para processar diferentes sintomas não motores da DP permanece desconhecida.

3.1.6 Papel do córtex pré-frontal no contexto da doença de Parkinson

O CPF está localizado numa região cerebral denominada de neocórtex, sendo esta a região do cérebro de evolução mais recente e apresenta-se como um substrato neural das habilidades mentais superiores dos mamíferos (VERTES, 2004). O CPF possui três regiões principais: o CPF dorsal, o CPF medial (CPFm) e o córtex orbitofrontal ventral (KANDEL *et al.*, 2014). Vamos nos ater ao CPFm que é o foco desse trabalho. A rede neural do CPFm é formada principalmente por células piramidais excitatórias (80-90% do total) e por interneurônios GABAérgicos inibitórios (10-20%). Cada uma dessas populações neuronais pode ser subdividida em tipos celulares diferentes, com base em aspectos relacionados à morfologia, à fisiologia e às propriedades moleculares (para revisão ver RAKIC, 2009; RIGA *et al.*, 2014).

O CPFm é uma região cerebral importante para diversas funções cognitivas e processos executivos de atenção, tomada de decisão e flexibilidade comportamental (VAN AERDE & FELDMEYER, 2013). Nos roedores, o CPFm inclui, dentre outras regiões os córtices pré-límbico (PL) e infralímbico (IL) que, em conjunto, são considerados homólogos ao córtex cingulado subgenual em humanos (DREVETS *et al.*, 1997). A atividade neuronal dessa região encontra-se reduzida na depressão maior (DREVETS, PRICE & FUREY, 2008; DREVETS *et al.*, 1997) e é responsiva aos tratamentos antidepressivos, incluindo a estimulação cerebral profunda (MAYBERG *et al.*, 2000, 2005).

O IL está envolvido com o comportamento impulsivo e com a formação dos hábitos, enquanto que o PL está relacionado com a flexibilidade comportamental, que é um componente que está comprometido nos transtornos do humor como a depressão (MARQUIS, KILLCROSS & HADDON, 2007; RAGOZZINO, 2007). A flexibilidade comportamental é a habilidade de adequação rápida às estratégias de resposta perante alguma situação nova imposta pelo ambiente (GILBERT & BURGESS, 2008). Dessa maneira, alterações no funcionamento do PL podem conduzir a prejuízos no processo de flexibilidade comportamental, podendo estar relacionadas também com a depressão. Nesse sentido, pacientes diagnosticados com depressão maior apresentavam prejuízos de flexibilidade comportamental e

disfunções neuronais nas vias corticais e/ou estriatais (REMIJNSE *et al.*, 2013; SCHMID & HAMMAR, 2013).

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que situações estressantes induzem prejuízos na flexibilidade comportamental em ratos (NAEGELI *et al.*, 2013). O CPF parece ser uma região cerebral bastante envolvida com a flexibilidade comportamental. Foi observado um aumento na sensibilidade ao antidepressivo imipramina em camundongos que não expressavam os receptores de glicocorticoides no CPF (HUSSAIN & JACOBSON, 2015). Já o tratamento com fluoxetina foi capaz de diminuir, de maneira dependente da dose, o tempo de imobilidade avaliado no teste do nado forçado, além de diminuir a ativação do PL em ratos (JANG *et al.*, 2009). Em situações de estresse inescapável, os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) são reduzidos no CPFm em ratos considerados suscetíveis quando comparados aos animais controle ou aos ratos resilientes (aqueles capazes de se adaptar após uma situação estressante) (YANG *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que ratos suscetíveis (que não se adaptam às situações estressantes) também apresentaram uma diminuição na densidade de espinhas dendríticas nos neurônios do córtex PL (YANG *et al.*, 2015).

O principal sistema de neurotransmissão acometido na DP é o dopaminérgico (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003) que está envolvido com a execução de funções motoras, de funções emocionais e de cognitivas (DE LA FUENTE-FERNÁNDEZ, 2013; TRITSCH & SABATINI, 2012). A dopamina modula a atividade neural de células piramidais no CPF de ratos (GULLEDGE & JAFFE, 2001). Além disso, já foi evidenciado que a dopamina modula a atividade dos interneurônios inibitórios nessa mesma região cerebral (TIERNEY *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que a modulação dos receptores D1 (D1R) para dopamina no PL altera a sensibilidade motora de ratos adolescentes a doses baixas de anfetamina (MATHEWS & MCCORMICK, 2012).

É necessário lembrar que transtornos psiquiátricos ou doenças neurológicas envolvem múltiplos sistemas de neurotransmissores (**Fig. 11**). Assim, focaremos na conectividade dopaminérgica corticoestriatal sem, todavia, negligenciar o envolvimento e a importância de outros circuitos cerebrais relacionados com tais condições patológicas.

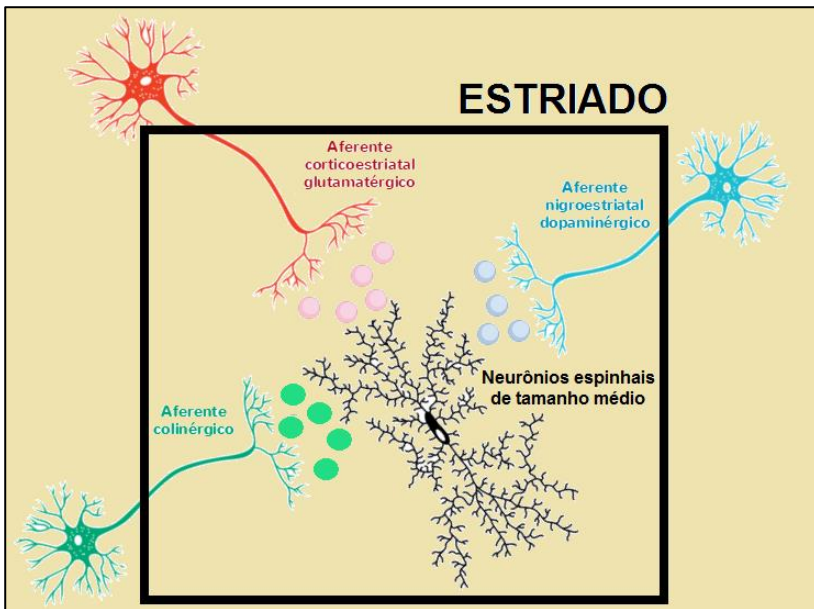


Figura 13: Esquema representando sistemas de neurotransmissão envolvidos com as funções dos neurônios espinhais de tamanho médio gabaérgicos. Em vermelho é indicado o componente cortical glutamatérgico (excitatório), em azul a aferência dopaminérgica nigroestriatal (excitatória e inibitória) e em verde o aferente vagal colinérgico (excitatório). Acervo do autor.

As projeções neuronais corticoestriatais são monossinápticas excitatórias (glutamatérgicas), controladas por neurônios dopaminérgicos e importantes para a manutenção dos comportamentos motivados (SHEPHERD, 2013). Os neurônios corticais são oriundos da camada 5 e podem projetar seus axônios de duas formas. A primeira são os neurônios intratelencefálicos (IT) que se projetam para o estriado de maneira ipsi ou bilateral através do corpo caloso ou cápsula interna. Esses enviam projeções para os neurônios espinhais de tamanho médio (MSN, do inglês *medium spiny neurons*) da via direta e atuam prioritariamente via receptores dopaminérgicos do tipo D1 (acoplados à uma proteína G estimulatória – Gs). A segunda forma são os neurônios do trato piramidal (TP) que enviam projeções para o estriado somente de modo ipsilateral. Os TP projetam para os MSN da via indireta e atuam

prioritariamente via os receptores dopaminérgicos do tipo D2 (acoplados à uma proteína G inibitória – Gi) (SHEPHERD, 2013).

O principal foco das pesquisas na DP sempre foi o entendimento das alterações nas conexões nos núcleos da base. No entanto, nos últimos anos vem aumentando o interesse sobre o envolvimento na DP de outras regiões cerebrais. Alterações nas vias corticocorticais e corticoestriatais parecem estar envolvidas nos processos neurobiológicos relacionados à DP. Modelos teóricos sugerem que em estágios avançados da patologia, ou seja, com comprometimento motor, ocorra diminuição da atividade cortical nos neurônios TP (SHEPHERD, 2013). Porém, os mecanismos subjacentes a essas alterações e sua relação com os prejuízos comportamentais, sejam esses motores ou não motores, ainda não foram desvendados.

Dessa maneira, torna-se relevante o estudo do papel modulatório da dopamina nos neurônios do CPF e a sua participação no processamento de informações comportamentais relacionadas aos sintomas não motores da DP. Neste sentido, investigamos no presente estudo os prejuízos relacionados à depressão e à anedonia em ratos lesionados com 6-OHDA, e a possível dissociação do envolvimento do EDL e do CPFm em tais sintomas que ocorrem precocemente na DP.

3.2 Objetivos específicos

Entre os objetivos específicos estão os de: avaliar temporalmente os efeitos da injeção de 6-OHDA no EDL sobre:

- Os comportamentos relacionados à depressão e à anedonia em ratos;
- Os níveis de marcadores do sistema dopaminérgico no estriado e no CPF;
- Alguns parâmetros eletrofisiológicos em fatias de EDL e de CPFm;
- A sensibilidade à dopamina de populações neuronais em fatias de EDL e de CPFm.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Testes para avaliação dos comportamentos relacionados à anedonia, depressão e ansiedade

3.3.1.1 *Preferência por sacarose*

O consumo de sacarose é frequentemente usado como uma medida de anedonia em roedores (CRAFT & DEVRIES, 2006; TADAIESKY *et al.*, 2008). Os animais foram alojados no biotério em gaiolas individuais com livre acesso à ração. Conforme pode ser observado na **Fig. 12**, no primeiro dia foram apresentadas duas garrafas de água nos lados opostos da gaiola para que o animal se adaptasse a beber de ambas garrafas. Após essa fase de treino, uma das garrafas de água foi substituída, de forma aleatória, por outra contendo solução de sacarose 0,8% (SLATTERY, MARKOU & CRYAN, 2007). Vinte e quatro horas depois, as garrafas foram invertidas de posição. Após novo intervalo de 24 h o consumo de água e da solução de sacarose foi aferido simultaneamente nos grupos controle e injetados com 6-OHDA.

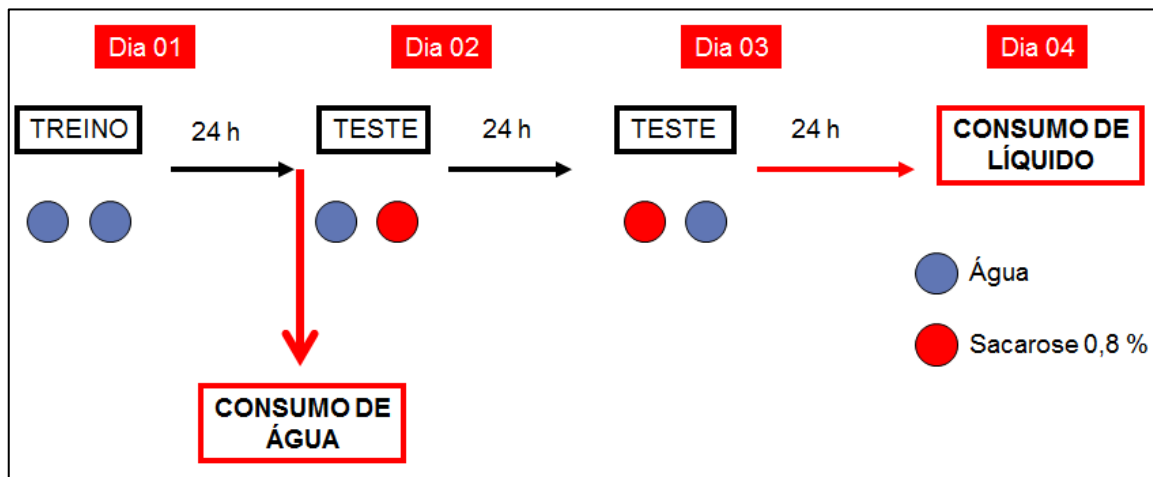


Figura 14: Protocolo experimental do teste de preferência por sacarose utilizado para a avaliação de comportamentos relacionados à anedonia em ratos. Os animais escolhiam livremente entre beber água (círculo azul) ou uma solução de sacarose 0,8% (círculo vermelho) presentes em duas garrafas nos lados opostos da gaiola moradia. Acervo do autor.

3.3.1.2 *Teste do Esguicho (do inglês splash test)*

O teste foi realizado com iluminação ambiente de baixa intensidade (12 lux). O procedimento consistiu em esguichar por duas vezes uma solução de sacarose 10% sobre o dorso do rato. Em seguida, os animais foram colocados numa caixa de acrílico para a avaliação comportamental. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose se adere à pelagem dos ratos e estes iniciam o comportamento de autolimpeza (do inglês *grooming*). Depois de aplicada a solução de sacarose, os animais foram observados por um período de 15 min e registrou-se o tempo de autolimpeza direcionado ao dorso como uma medida de autocuidado e comportamento motivacional. Após o fim de cada teste, a caixa de acrílico foi cuidadosamente limpa com uma solução de etanol 10% e seca com papel toalha. O teste avalia uma forma de comportamento motivacional considerado semelhante com alguns sintomas de anedonia e com o comportamento apático (WILLNER, 2005).

3.3.1.3 *Teste do nado forçado*

O procedimento utilizado neste teste foi previamente descrito por Porsolt, Le Pichon & Jalfre (1977) e posteriormente modificado por Cryan, Valentino & Lucki (2005). Os ratos foram colocados individualmente em cilindros de cloreto de polivinila (PVC) individuais medindo 60 cm de altura e 30 cm de diâmetro preenchido até a metade com água em temperatura de 25 ± 1 ° C. Foram realizadas duas sessões de natação, uma inicial de 15 min (chamada de pré-teste), seguida 24 horas depois por outra de teste que durou apenas 5 min. A duração total dos comportamentos de imobilidade, de escalada e de natação foi aferida manualmente e continuamente durante todo o período da sessão de teste. O animal foi considerado imóvel quando flutuava ou fazia apenas os movimentos necessários para manter a sua cabeça acima do nível da água. O comportamento de escalada foi considerado quando o animal realizava movimentos com as patas anteriores em direção ao topo das paredes do cilindro. A natação foi considerada quando os ratos se movimentavam horizontalmente em todas as direções no cilindro. Os comportamentos avaliados podem ser observados na **Fig. 15**. Os

experimentos foram executados com iluminação de 40 lux e a água foi trocada após o final de cada sessão.

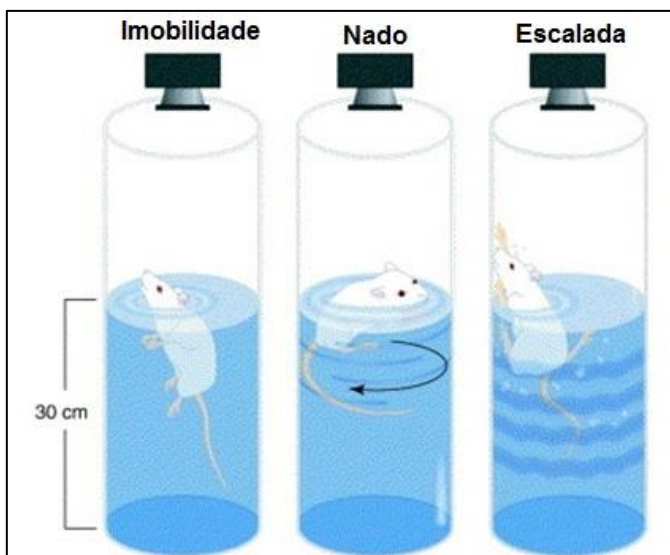


Figura 15: Comportamentos relacionados à depressão avaliados no teste do nado forçado durante a sessão de teste (5 min) (modificado de CRYAN, MARKOU & LUCKI, 2002).

3.3.1.4 Interação social

O protocolo do teste foi adaptado de dois estudos anteriores (KOROS *et al.*, 2007; O'SHEA, MCGREGOR & MALLET, 2006). Todos os ratos de uma determinada caixa receberam o mesmo tratamento: 6-OHDA ou veículo. A habituação à caixa de teste (40 x 40 x 40 cm) foi realizada em dois dias consecutivos, nos quais os animais exploraram a caixa durante 10 min por dia. No dia do teste, dois ratos de ninhadas diferentes, que tinham recebido o mesmo tratamento e que não haviam sido previamente familiarizados entre si foram colocados simultaneamente no interior da caixa de teste em cantos opostos. Os comportamentos de interação social foram avaliados durante 10 min e, em seguida, os animais foram devolvidos às gaiolas moradia de origem. Para evitar a presença de pistas olfatórias, ao final de cada teste, o

equipamento foi limpo com uma solução de etanol 10% e seco com papel toalha. Os comportamentos sociais avaliados durante o teste incluíram: cheirar, seguir, montar, pular sobre e rastejar por baixo do parceiro (**Fig. 16**). O tempo gasto por cada rato da dupla realizando os comportamentos descritos acima foi somado para gerar o tempo de interação social da dupla de animais.

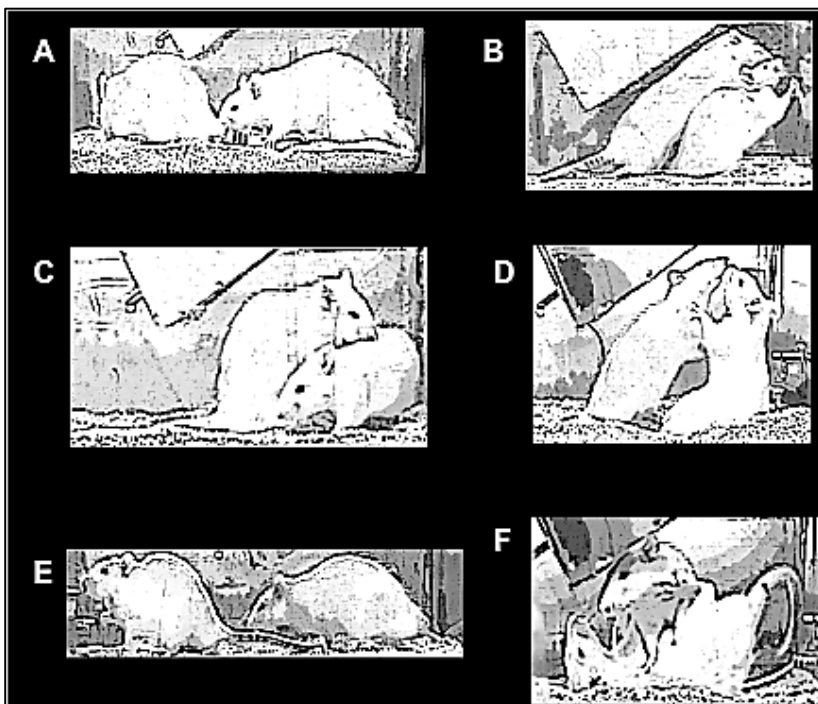


Figura 16: Comportamentos sociais usualmente observados no teste de interação social em ratos (modificado de MOURA & XAVIER, 2010). (A) Investigação anogenital. (B) Investigação de cabeça. (C) Investigação do corpo (D) Comportamentos agressivos. (E) Perseguição. (F) Comportamento de dominância.

3.3.1.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE consiste num aparato em forma de cruz formado por dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), dispostos de tal modo que dois pares de braços idênticos são opostos um

ao outro. Os braços se iniciam a partir de uma plataforma central (10 x 10 cm), e todo o aparato está elevado a uma altura de 50 cm do chão (**Fig. 17**). Os experimentos foram realizados em condições de luminosidade reduzida (12 lux). No início do teste o rato foi colocado na plataforma central com a cabeça voltada para um braço fechado. Os comportamentos relacionados ao medo/ansiedade foram avaliados durante 5 min e foram quantificados os seguintes parâmetros comportamentais: porcentagem de entradas nos braços abertos ($\% \text{ entradas nos braços abertos} = \text{entradas nos braços abertos} \times 100 / \text{total de entradas}$) e porcentagem de tempo nos braços abertos ($\% \text{ tempo nos braços abertos} = \text{tempo nos braços abertos} \times 100 / \text{tempo nos braços abertos} + \text{tempo nos braços fechados}$). Ambas as medidas estão inversamente relacionados com os níveis de comportamentos tipo medo/ansiedade em roedores. A locomoção dos animais também foi avaliada com base no número total de entradas nos braços fechados que é considerado o melhor indicador da atividade locomotora em roedores no teste do LCE (CRUZ, FREI & GRAEFF, 1994; DAWSON & TRICKLEBANK, 1995). O critério considerado para a entrada em um braço era de corpo inteiro e as quatro patas dentro do braço. Ao final de cada teste, o labirinto foi limpo com uma solução de etanol 10% e seco com papel toalha.



Figura 17: Labirinto em cruz elevado utilizado para a avaliação das respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos. Fonte: Insight®.

3.3.2 Western blotting para marcadores dopaminérgicos (D1R, D2R e DAT)

Os animais foram anestesiados com isoflurano e rapidamente ortotomizados por decapitação. O estriado e o CPF foram rapidamente dissecados em gelo seco e armazenados a -80 °C até a determinação dos níveis dos receptores para dopamina (D1R e D2R) e do DAT. Os tecidos foram cuidadosamente homogeneizados em HEPES 10 mM (pH 7,4) contendo 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 10 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL inibidor de tripsina de soja, 10 µg/mL de pepstatina, 10 µg/mL de leupeptina e 0,5 mM de ditiotreitol e mantidos em gelo durante 15 min. Em seguida foram agitados vigorosamente durante 15 min na presença de 0,1% de Nonidet P-40. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g durante 30 min, e os sobrenadantes resultantes considerados como o extrato total de estriado e CPF foram recolhidos e armazenados a -80 °C até à sua utilização. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada utilizando o *kit* de ensaio de proteínas da Bio-Rad (Bio-Rad, EUA). Quantidades equivalentes de proteínas (40 µg) foram misturadas em tampão (Tris 200 mM, glicerol a 10%, SDS a 2%, b-mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol a 0,04%) e aquecidas durante 20 min a 70 °C. As proteínas foram separadas em géis SDS-PAGE de 10% e detectadas imunologicamente após a eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (*Amersham-Pharmacia Biotechnology*, EUA). As proteínas e os marcadores de peso molecular (BioRad, Mississauga, Canadá) foram visualizados através da coloração de Ponceau Red. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas em PBS contendo 5% de leite em pó e 0,05% de Tween-20 durante 1 h a 25 °C. As membranas foram então incubadas a 4 °C durante a noite com o anticorpo primário anti-D1R de coelho (1:1000, sc-14001; Santa Cruz *Biotechnology*, EUA), anticorpo anti-D2R de camundongo (1:1000, sc-5303, Santa Cruz *Biotechnology*, EUA) ou anti-anticorpo anti-DAT de rato (1:10.000, MAB369; Milipore, Alemanha) em solução de bloqueio. Após esse período, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (1:1000) conjugados com *horseradish peroxidase* (HRP) com anticorpo anti-coelho, anticorpo anti-camundongo e anticorpo anti-rato durante 2 h, respectivamente. As bandas foram visualizadas utilizando o sistema ECL (PerkinElmer, EUA).

3.3.3 Eletrofisiologia extracelular

3.3.3.1 Preparação das fatias

Os animais foram anestesiados sob atmosfera de halotano e decapitados em guilhotina. Os cérebros foram rapidamente coletados e colocados em solução de fluido cerebrospinal artificial (FCSA) gelada com a seguinte composição, em mM: NaCl 125, KCl 3, MgSO₄ 1, CaCl₂ 2, Na₂HPO₄ 1,25 NaHCO₃ 25 e glicose 11, pH 7,4, gaseificado com uma mistura carbogênica de O₂ 5% e CO₂ 95%. Fatias coronais contendo o córtex pré-frontal medial (CPFm) (300 µm de espessura) ou o estriado dorsolateral (EDL) (400 µm de espessura) foram cortadas com um sistema de corte vibratório 1500 (Vibratome, Alemanha). As fatias foram então transferidas para uma pré-câmara que continha FCSA, sob oxigenação contínua (com carbogênio), para recuperação do procedimento de fatiamento, a 32 °C durante 90 min (COSTENLA et al., 2013).

3.3.3.2 Registros eletrofisiológicos extracelulares

As fatias foram transferidas para uma câmara de registo onde foram continuamente perfundidas com FCSA oxigenado entre 30-32 °C a uma taxa de 2-3 mL/min. Registros de campo extracelular foram obtidos com micropipetas (2-4 mQ) preenchidas com uma solução 4 M de NaCl. Um eletrodo de estimulação bipolar concêntrico PND-100 (Kopf, Alemanha) foi colocado na camada II/III do CPFm pré-límbico aplicando pulsos retangulares (60-150 µA) de 0,1 ms de duração aplicados com um estimulador Digitimer DS3 (Digitimer LTD, Reino Unido) uma vez a cada 20 segundos numa frequência de 0,05Hz. No EDL, os estímulos foram aplicados com pulsos retangulares (60-150 µA) de 0,1 ms de duração através de um estimulador S44 (Grass Instruments, West Warwick, RI) em uma frequência de 0,05 Hz através de um fio de tungstênio bipolar colocado na matéria branca acima do EDL (via corticoestriatal). A resposta de pico da população neuronal foi realizada para registrar a eficácia sináptica. A resposta de pico da população neuronal foi registrada através de um microeletrodo extracelular (4 M NaCl, 2-8 resistência MΩ) colocado na camada V do CPFm pré-límbico. Os registros foram obtidos com um amplificador AxonPatch 200B (Axon Instruments®, EUA), acoplado a um Digitimer.

Os registros para o EDL foram obtidos com um amplificador ISO-80 (Instrumentos de Precisão Mundial, Hertfordshire, Reino Unido) e digitalizados usando uma placa ADC-42 (Pico Technologies, Pelham, NY, EUA). Três respostas consecutivas foram monitoradas continuamente e realizou-se uma média com essas medidas. As respostas foram digitalizadas em 10 KHz e continuamente monitoradas em um computador pessoal com o programa WinLTP 1.1, gentilmente cedido por WW Anderson (Universidade de Bristol, U.K.). As respostas foram quantificadas como a amplitude dos registros de pico da população neuronal. Após a estabilização do sinal, foi obtida uma curva de estímulo-resposta. Em seguida, a intensidade do estímulo foi ajustada para se obter 40-50% da resposta máxima antes da estimulação por pulsos pareados e/ou antes da adição de três concentrações crescentes de dopamina (25, 50 e 100 μ M). O posicionamento dos eletrodos de estimulação e das micropipetas de registro nas fatias de CPFm e de EDL pode ser observado na **Figura 18**.

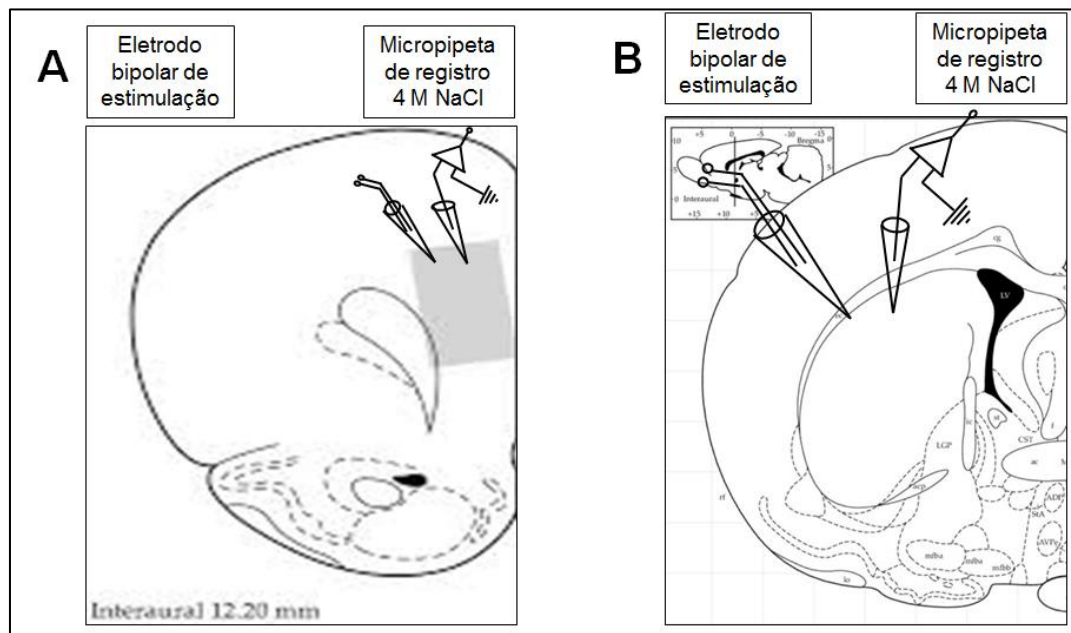


Figura 18: Posicionamento dos eletrodos de estimulação e das micropipetas de registro (A) Diagrama indicando o posicionamento do eletrodo bipolar de estimulação na camada neuronal II/III e da micropipeta de registro na camada neuronal V do CPFm pré-límbico, (B) Diagrama indicando o posicionamento do eletrodo bipolar de estimulação na via córticoestriatal e da micropipeta de registro no EDL.

3.3.3.3 Estimulação por pulsos pareados (PPS do inglês paired pulse stimulation)

Após obter respostas neuronais basais estáveis a pulsos simples a 0,05Hz durante 10 min, foram aplicados 2 estímulos com um intervalo de 50 ou 250 ms para as fatias de CPFm. Para as fatias de EDL os intervalos foram de 20 ou 160 ms. A razão das respostas aos pulsos pareados (PPR) foi calculada como a razão entre a resposta aferida para o segundo estímulo sobre a resposta aferida para o primeiro.

3.3.3.4 Experimento de avaliação da sensibilidade à dopamina

No experimento de sensibilidade à dopamina as fatias ficavam estáveis por 10 min. Após isso as fatias foram submetidas ao protocolo da curva estímulo-resposta para se determinar 40 – 50% da resposta máxima. Em seguida, as fatias foram perfundidas com as 3 concentrações crescentes de dopamina (25, 50 e 100 mM) durante 30 min para cada concentração e registrou-se a alteração da magnitude das respostas em relação às respostas basais.

3.3.4 Análises estatísticas

A análise estatística para testes comportamentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. As variáveis independentes utilizadas foram tratamento (controle vs. 6-OHDA) e tempo (7 vs. 21 dias). A análise dos dados eletrofisiológicos foi realizada usando teste t de Student para amostras pareadas. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância considerado como indicativo de diferenças significativas foi $P < 0.05$. Todas as análises foram realizadas com o *software* Statistica 7®.

3.3.5 Protocolo experimental

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica bilateral para a injeção de 6-OHDA no EDL (**Fig. 19**). Após 7 ou 21 dias, grupos independentes de animais foram avaliados nos testes comportamentais para a investigação de alterações não motoras, tais como preferência por

sacarose e o teste do esguicho (respostas relacionadas à anedonia), teste do nado forçado (respostas relacionadas à depressão), o teste de interação social (para avaliar o comportamento de isolamento social) e o teste do labirinto em cruz elevado (respostas relacionadas à ansiedade). Cada animal foi testado uma única vez. Após o término dos testes comportamentais, os ratos foram sacrificados e os cérebros foram coletados para a realização do Western blotting para quantificação dos marcadores do sistema dopaminérgico D1R, D2R e DAT no estriado e no CPF. Os registros eletrofisiológicos extracelulares foram feitos em fatias do EDL (via corticoestriatal) e do CPFm pré-límbico isolados de outros animais.

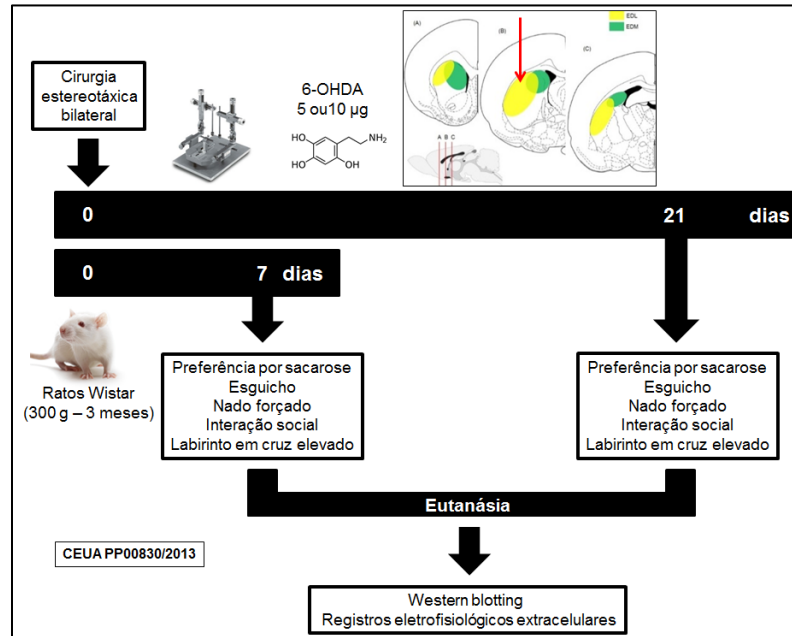


Figura 19: Protocolo experimental para o estudo dos sinais não motores. Sete ou 21 dias após a cirurgia, grupos independentes de animais foram testados nos testes de preferência por sacarose e esguicho (respostas relacionadas à anedonia), do nado forçado (respostas relacionadas à depressão), de interação social (para avaliar o comportamento de isolamento social) e no labirinto em cruz elevado (respostas relacionadas à ansiedade). Os cérebros coletados para as análises neuroquímicas e eletrofisiológicas.

3.4 Resultados

3.4.1 Seleção da dose de 6-OHDA para o estudo dos prejuízos não motores

O teste do nado forçado foi realizado no intuito de avaliar qual seriam os efeitos induzidos pela injeção bilateral das doses de 5 ou 10 µg de 6-OHDA (doses que anteriormente não induziram prejuízos motores). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator tratamento para os parâmetros avaliados, mas não para o fator tempo. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que somente a concentração de 10 µg de 6-OHDA foi capaz de alterar os parâmetros avaliados no teste do nado forçado (**Fig. 20**). A injeção de 10 µg/sítio de 6-OHDA aumentou o tempo de imobilidade (**Fig. 20A**, $F_{(2, 46)}=7,09$, $P<0,05$) e reduziu os tempos de nado (**Fig. 20B** $F_{(2, 46)}=6,78$, $P<0,05$) e de escalada (**Fig. 20C** $F_{(2, 46)}=3,06$, $P<0,05$) 21 dias após a infusão da neurotoxina. Dessa maneira, a dose de 10 µg/hemisfério foi selecionada para os experimentos subsequentes.

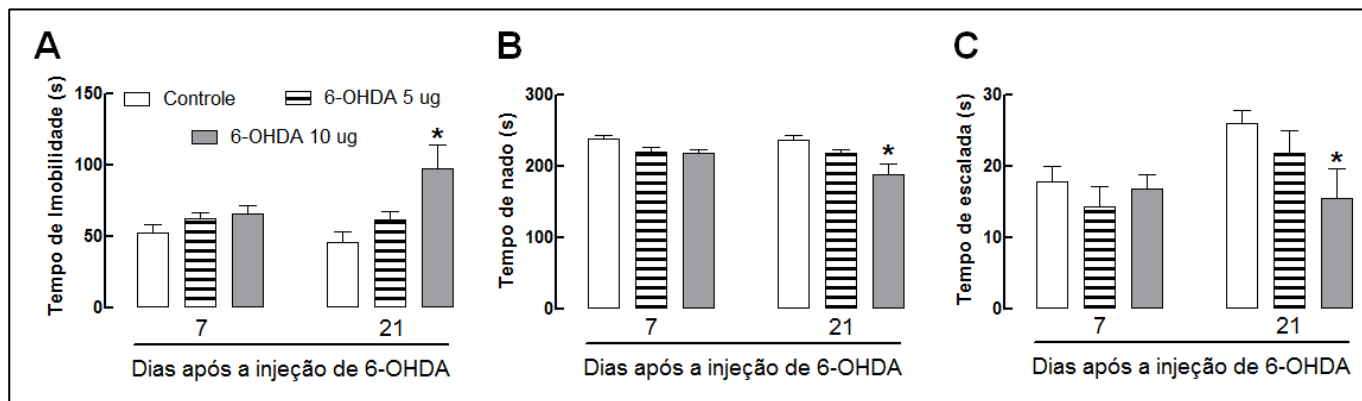


Figura 20: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (5 ou 10 μ g/hemisfério) intra-EDL sobre os parâmetros avaliados no teste do nado forçado. (a) Tempo de imobilidade, (b) Tempo de nado, (c) Tempo de escalada. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8-10$ /grupo).

3.4.2 A injeção intra-EDL de 6-OHDA induz comportamentos relacionados à anedonia 7 dias após a indução da lesão

No teste da preferência por sacarose, a ANOVA de duas indicou um efeito significativo dos fatores tratamento ($F_{(2, 27)}=5,30$, $P<0,05$) e tempo ($F_{(2, 27)}=4,06$, $P<0,05$), mas não houve efeito significativo para a interação entre estes fatores. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que no grupo lesionado com 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) houve uma diminuição no consumo de sacarose (**Fig. 21A**) 7 dias após a injeção da toxina. No teste do esguicho, a análise estatística mostrou efeitos significativos dos fatores tratamento ($F_{(1, 30)}=10,21$, $P<0,05$) e tempo ($F_{(1, 30)}=5,27$, $P<0,05$), mas não da interação entre estes fatores. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que a injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) diminuiu o tempo de autolimpeza quando comparado ao grupo controle (**Fig. 21C**). Esse perfil observado em ambos os testes é indicativo de um comportamento relacionado à anedonia, sendo este observado aos 7 dias após a injeção de 6-OHDA (**Fig. 21A**), mas não após 21 dias (**Fig. 21B-C**).

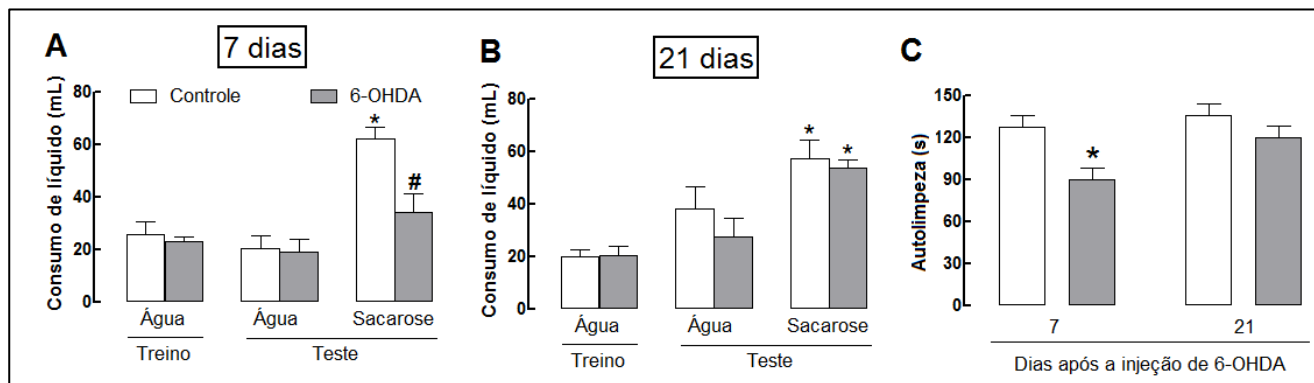


Figura 21: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/hemisfério) intra-EDL sobre comportamentos relacionados à anedonia em ratos. (a) Consumo de líquido 7 dias após a indução da lesão no teste da preferência por sacarose, (b) Consumo de líquido 21 dias após a indução da lesão no teste da preferência por sacarose, (c) Tempo de autolimpeza no teste do esguicho. * $P < 0.05$ comparado ao consumo de água, # $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8-10$ /grupo).

3.4.3 A injeção intra-EDL de 6-OHDA induz comportamentos relacionados à depressão e isolamento social 21 dias após a indução da lesão

No teste do nado forçado, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo somente para o fator tratamento nos parâmetros de imobilidade ($F_{(1, 32)}=10,66$, $P<0,05$), nado ($F_{(1, 32)}=11,13$, $P<0,05$) e escalada ($F_{(1, 32)}=6,14$, $P<0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os ratos lesionados com 6-OHDA (10 µg/sítio) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade (**Fig. 22A**) e uma diminuição nos tempos de nado (**Fig. 22B**) e de escalada (**Fig. 22C**) apenas aos 21 dias, mas não aos 7 dias após a injeção de 6-OHDA.

No teste de interação social, observamos o mesmo perfil de resposta temporal. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes dos fatores tratamento ($F_{(1, 26)}=85,39$, $P<0,05$) e tempo ($F_{(1, 26)}=34,94$, $P<0,05$), e também da interação entre estes fatores ($F_{(1, 26)}=21,03$, $P<0,05$) no tempo de interação social. A injeção bilateral da 6-OHDA (10 µg/sítio) diminuiu o tempo de interação social somente após 21 dias, como indicado pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls (**Fig. 22D**). A infusão de 6-OHDA diminuiu os comportamentos de cheirar, seguir, montar, pular sobre e rastejar sob o parceiro, sendo que estas alterações não foram observadas 7 dias após a injeção de 6-OHDA.

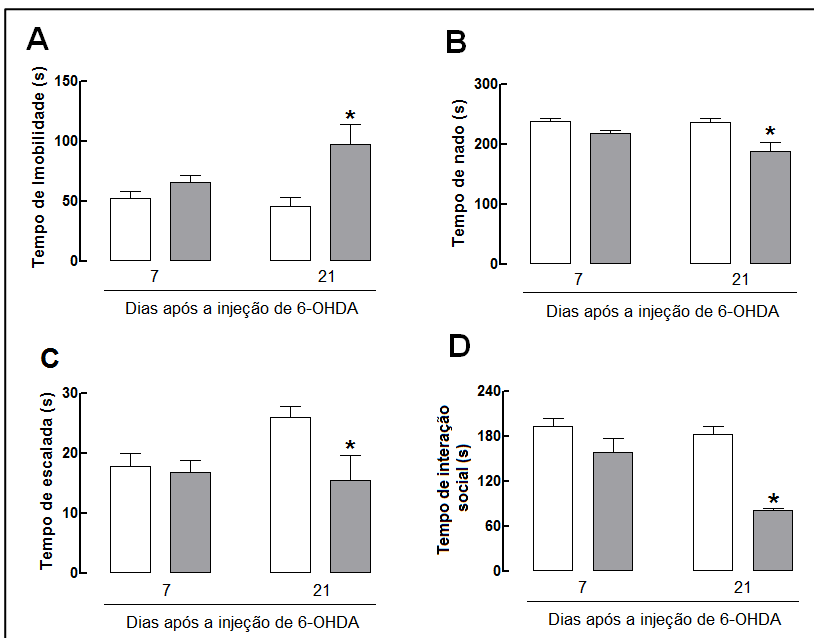


Figura 22: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 μ g/sítio) intra-EDL sobre os comportamentos relacionados à depressão e interação social. (a) Tempo de imobilidade, (b) Tempo de nado, (c) Tempo de escalada no teste do nado forçado; (d) Tempo total de investigação no teste da interação social. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8-10$ /grupo).

O teste do LCE foi realizado para investigar se a dose utilizada de 6-OHDA (10 μ g/sítio) causaria alguma alteração comportamental relacionada à ansiedade. A ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo para nenhum dos fatores (tratamento e tempo) nos comportamentos avaliados no LCE: entradas nos braços abertos (**Fig. 23A**), tempo nos braços abertos (**Fig. 23B**) e entradas nos braços fechados (**Fig. 23C**). Isso indica que características relacionadas à ansiedade não estão interferindo nos comportamentos observados nos testes de preferência por sacarose, teste do esguicho, nado forçado e interação social.

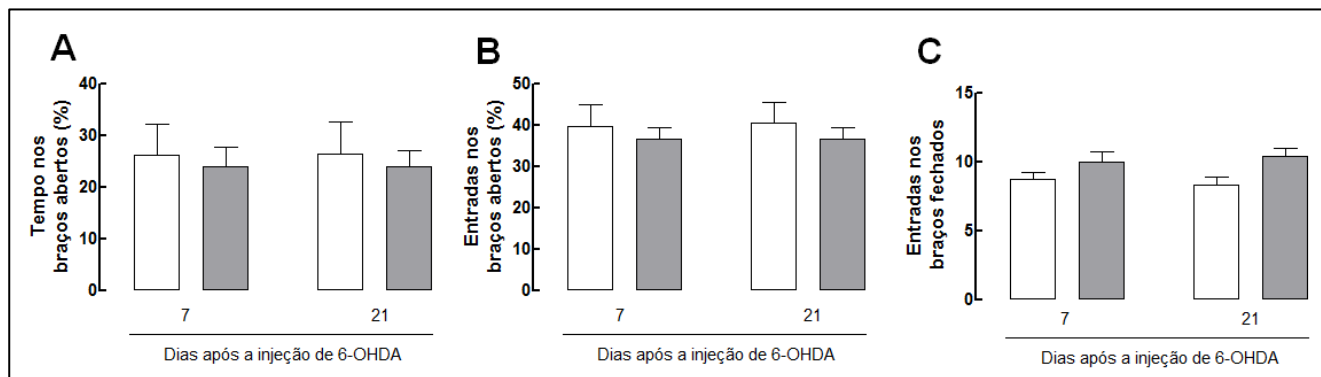


Figura 23: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 μ g/hemisfério) intra-EDL sobre comportamentos relacionados à ansiedade em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). (a) tempo nos braços abertos, (b) entradas nos braços aberto, (c) entradas nos braços fechados. ANOVA de duas vias (n= 8-10 /grupo).

3.4.4 Alterações temporais induzidas pela injeção de 6-OHDA no EDL em marcadores do sistema dopaminérgico no estriado e no CPF

Os comportamentos relacionados à anedonia, depressão e de isolamento social induzidos pela lesão com 6-OHDA foram acompanhados por alterações dependentes do tempo na densidade de marcadores dopaminérgicos. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo da interação entre os fatores tratamento e tempo para os níveis de D1R ($F_{(1, 18)} = 8,99$, $P < 0,05$) (**Fig. 24A**), D2R ($F_{(1, 18)} = 3,68$, $P < 0,05$) (**Fig. 24B**) e DAT ($F_{(1, 18)} = 4,98$, $P < 0,05$) (**Fig. 24C**) no estriado. Como pode ser observado na **Fig. 24**, 7 dias após a injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$), o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento nos níveis dos D1R e D2R no estriado no grupo tratado com 6-OHDA, sendo que estas medidas retornaram aos níveis semelhantes ao grupo controle 21 dias após a administração da toxina (**Fig. 24A-B**).

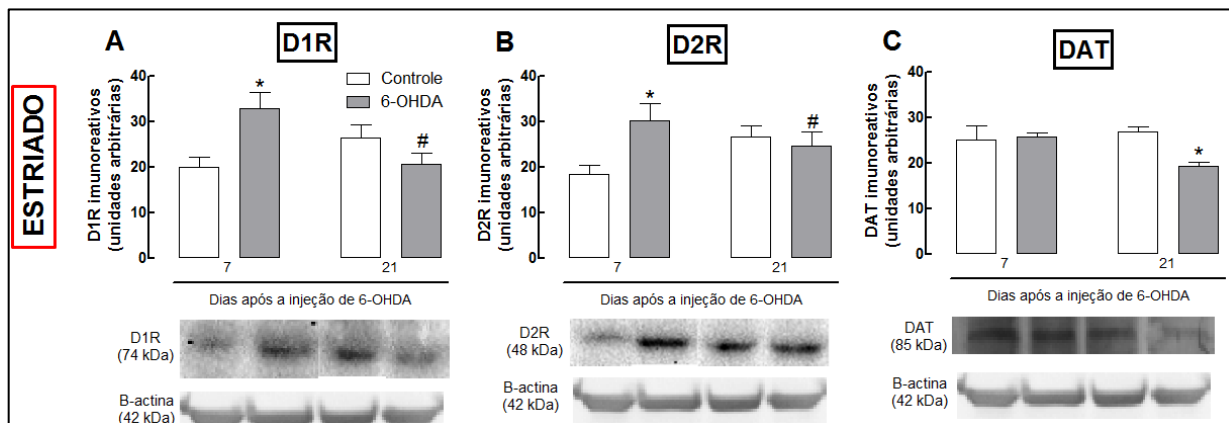


Figura 24: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/sítio) intra-EDL sobre os níveis dos marcadores dopaminérgicos no estriado avaliados por *Western blotting*. (a) Níveis dos D1R no extrato total de estriado, (b) Níveis dos D2R no extrato total de estriado, (c) Níveis dos DAT no extrato total de estriado. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA de 7 dias. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (n= 8-10 /grupo).

No CPF, a 6-OHDA não modificou os níveis dos D1R ou D2R em nenhum dos períodos de tempo avaliados (**Fig. 25A-B**). No entanto, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator tratamento para o marcador DAT no CPF ($F_{(1, 16)} = 7,07$, $P < 0,05$) e a interação entre tratamento vs. tempo ($F_{(1, 16)} = 4,29$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* indicou uma diminuição seletiva nos níveis de DAT 21 dias após a injeção de 6-OHDA (**Fig. 25C**).

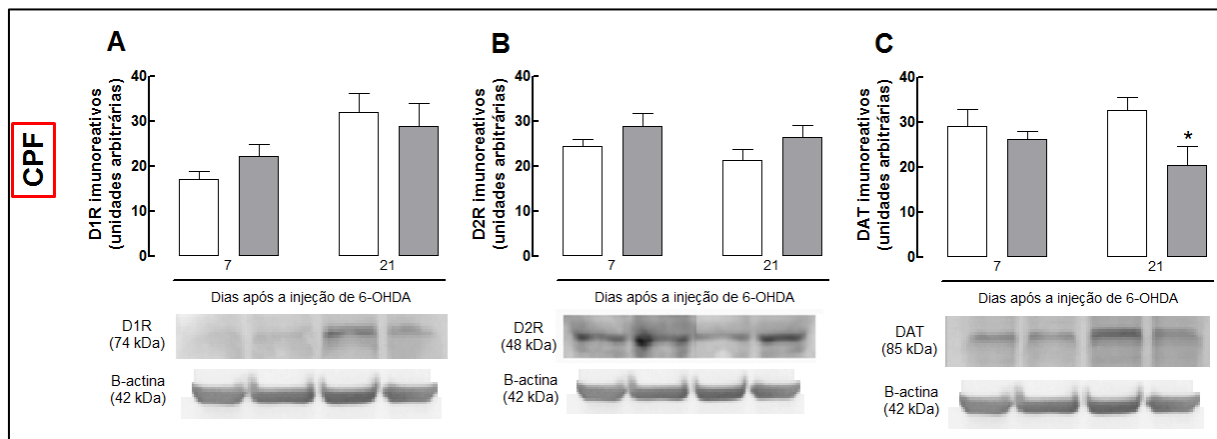


Figura 25: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 μ g/sítio) intra-EDL sobre os níveis dos marcadores dopaminérgicos no córtex pré-frontal (CPF) avaliados por *Western blotting*. (a) Níveis dos D1R no extrato total de CPF, (b) Níveis dos D2R no extrato total de CPF, (c) Níveis dos DAT no extrato total de CPF. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (n= 8-10 /grupo).

3.4.5 Efeitos da injeção de 6-OHDA no EDL sobre parâmetros eletrofisiológicos no estriado e CPF

A **Figura 26** mostra os registros de potencial de campo obtidos em fatias provenientes do grupo controle no EDL e no CPFm. Nessa figura pode ser observado os componentes pré- e pós-sinápticos dos registros extracelulares.

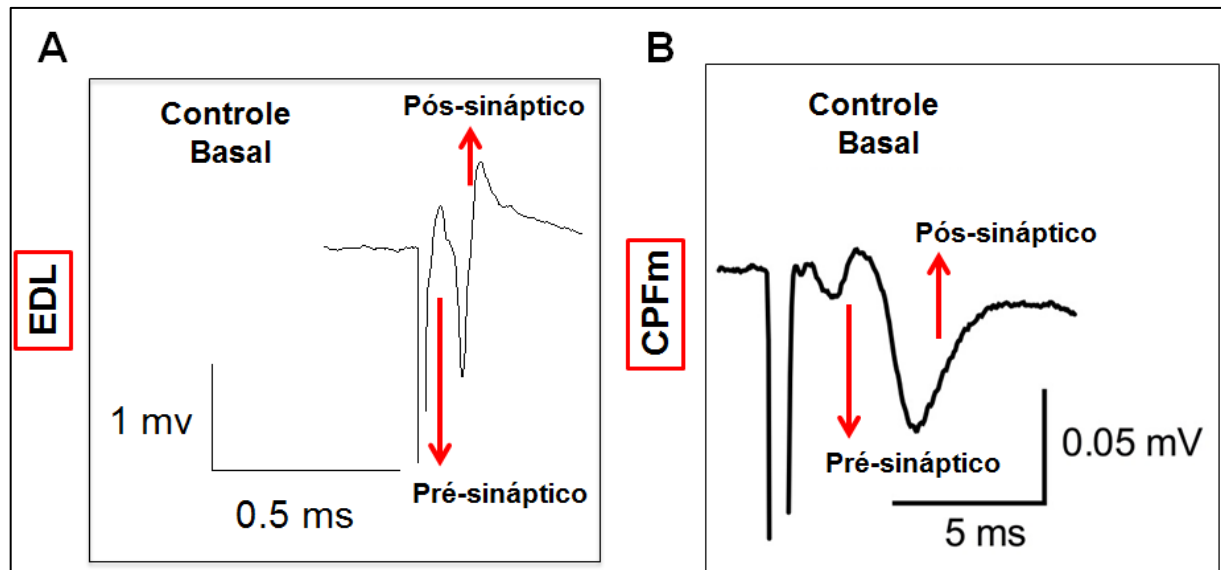


Figura 26: Registros eletrofisiológicos extracelulares obtidos em fatias de EDL e CPFm provenientes de animais controle. (a) Registro de potencial de campo em fatia de EDL do grupo controle, (d) Registro de potencial de campo em fatia de CPFm do grupo controle. Setas vermelhas indicam os componentes pré- e pós-sinápticos, respectivamente.

Os registros eletrofisiológicos extracelulares nas fatias de EDL e de CPFm revelaram que a administração bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) não alterou a relação estímulo-resposta em nenhum dos tempos avaliados (7 ou 21 dias após a lesão) (**Fig. 27**). Estes resultados indicam que não ocorreram alterações na densidade sináptica nas fatias de EDL e CPFm.

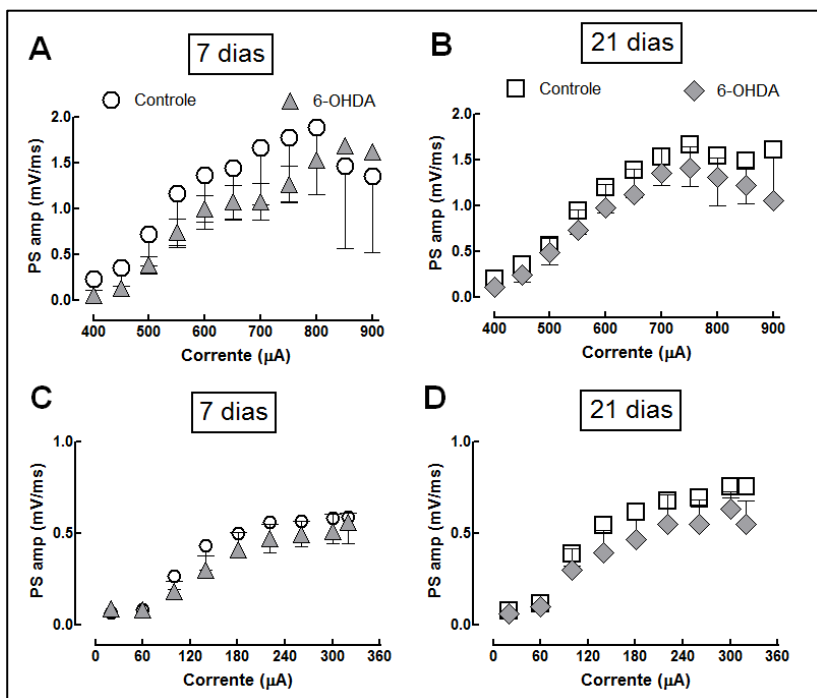


Figura 27: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para a curva de estímulo/resposta em fatias de EDL e CPFm (a) Curva de estímulo/resposta em fatias de EDL avaliadas 7 dias após a lesão, (B) Curva de estímulo/resposta em fatias de EDL avaliadas 21 dias após a lesão, (c) Curva de estímulo/resposta em fatias de CPFm avaliadas 7 dias após a lesão, (d) Curva de estímulo/resposta em fatias de CPFm avaliadas 21 dias após a lesão. (Teste *t* de Student) ($n = 4$ /grupo).

No experimento de estimulação por pulsos pareados com o intervalo entre os pulsos de 20 ms, o teste *t* de Student revelou uma

diminuição significativa da facilitação de pulso pareado no EDL somente 7 dias após a lesão com 6-OHDA (**Fig. 28A**, $t=3,41$, $P<0,05$). Esse perfil é indicativo de alterações pré-sinápticas no EDL nos períodos iniciais após a lesão com a toxina. No entanto, as respostas à estimulação por pulsos pareados com intervalo de 50 ms no CPFm pré-límbico não foram modificadas (**Fig. 28C**). Quando foi utilizado um intervalo de tempo de 160 ms no EDL e de 250 ms no CPFm pré-límbico não foram observados efeitos da lesão com 6-OHDA (**Fig. 28B e 28D**). A utilização desses intervalos de tempo mais longos serve para avaliação da atividade dos interneurônios inibitórios.

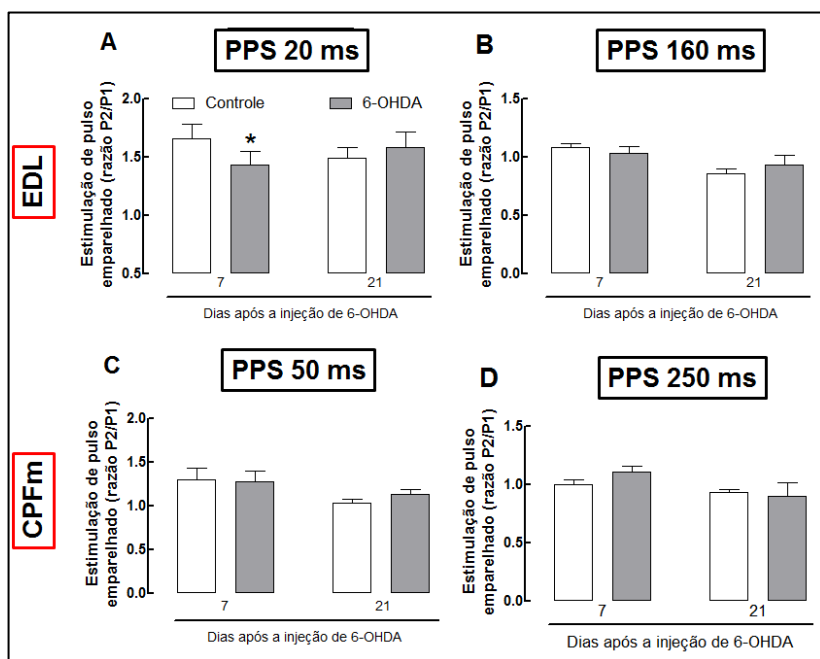


Figura 28: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para a estimulação de pulsos pareados em fatias de EDL e CPFm. Estimulação de fatias de EDL 7 e 21 dias após a indução da lesão com pulsos pareados (razão do segundo vs. primeiro pulso, P2/P1 razão) com o intervalo entre os pulsos (A) de 20 ms e (B) de 160 ms, Estimulação de fatias de CPFm 7 e 21 dias após a indução da lesão com pulsos pareados (razão do segundo vs. Primeiro pulso, P2/P1 razão) com o intervalo

entre os pulsos (C) de 50 ms e (D) de 250 ms. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student) ($n = 4$ /grupo).

3.4.6 A injeção de 6-OHDA intra-EDL induz alterações na sensibilidade à dopamina no EDL e no CPFm pré-límbico: dissociação temporal e estrutural

A injeção de 6-OHDA induziu alterações dependentes do tempo nos níveis de receptores para dopamina (D1R e D2R) e DAT no estriado e no CPF, como mostrado anteriormente (**Figs. 24 e 25**). Dessa maneira, avaliou-se a ocorrência de possíveis alterações induzidas pela lesão bilateral com 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) na sensibilidade à dopamina sobre a transmissão sináptica nas fatias de EDL e CPFm pré-límbico. Na **Fig. 29** pode ser observado que a dopamina aumentou a transmissão sináptica basal no EDL dos animais lesionados com a 6-OHDA, quando comparado ao grupo controle. Esse incremento foi obtido quando perfundiu-se as fatias com dopamina nas concentrações de 25 μM ($75 \pm 31\%$ do valor basal, $n = 4$; $t = 22,75$, $P < 0,05$) e 50 μM ($64 \pm 35\%$ do valor inicial, $n = 4$, $t = 11,01$, $P < 0,05$) (**Fig. 29**). A concentração de 100 μM de dopamina reduziu a transmissão sináptica no grupo 6-OHDA quando comparado com a concentração de 50 μM ($48 \pm 6\%$ de redução, $t = 17,62$, $P < 0,05$). No entanto, a transmissão sináptica no grupo 6-OHDA continuou significativamente maior do que a do grupo controle, mesmo na presença da maior concentração de dopamina ($t = 21,99$, $P < 0,05$) (**Fig. 29**).

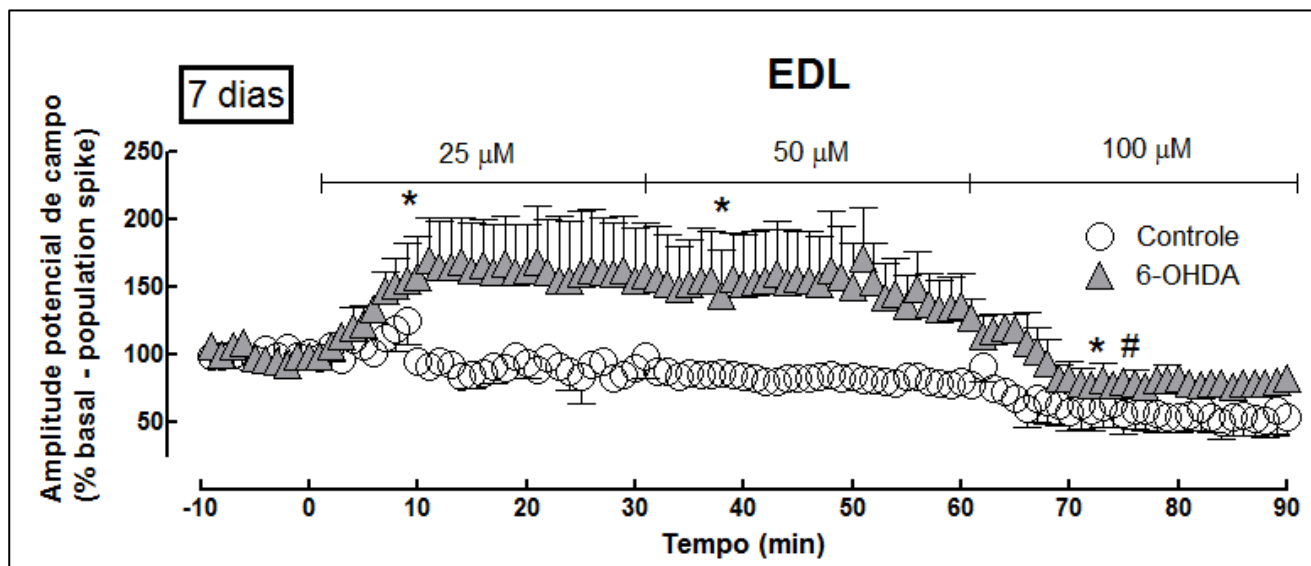


Figura 29: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 μ g/sítio) intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade à dopamina em fatias de EDL 7 dias após a injeção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ quando comparado a concentração de 50 μ M do grupo 6-OHDA. Teste t de Student ($n = 4$ /grupo).

A análise estatística não indicou alteração na sensibilidade das populações neuronais à dopamina nas fatias de CPFm pré-límbico 7 dias após a lesão com 6-OHDA (**Fig. 30**).

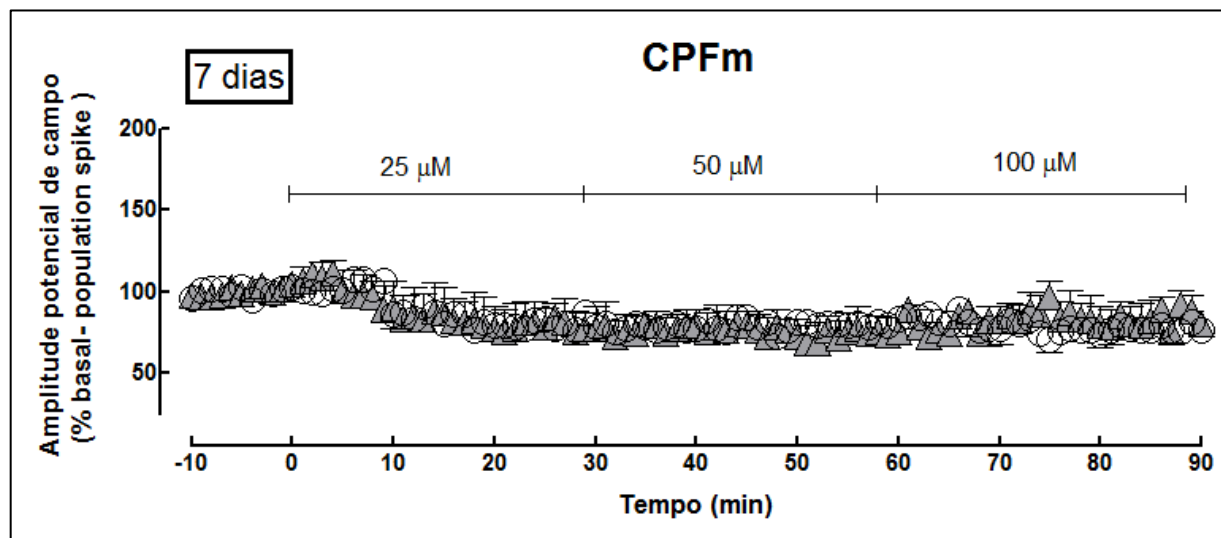


Figura 30: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade à dopamina em fatias de CPFm pré-límbico 7 dias após a injeção. Teste *t* de Student ($n=4$ /grupo).

Avaliou-se também a sensibilidade à dopamina no EDL e CPFm pré-límbico 21 dias após a injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/sítio) no EDL. Não houve alterações de sensibilidade à dopamina no EDL (**Fig. 31**).

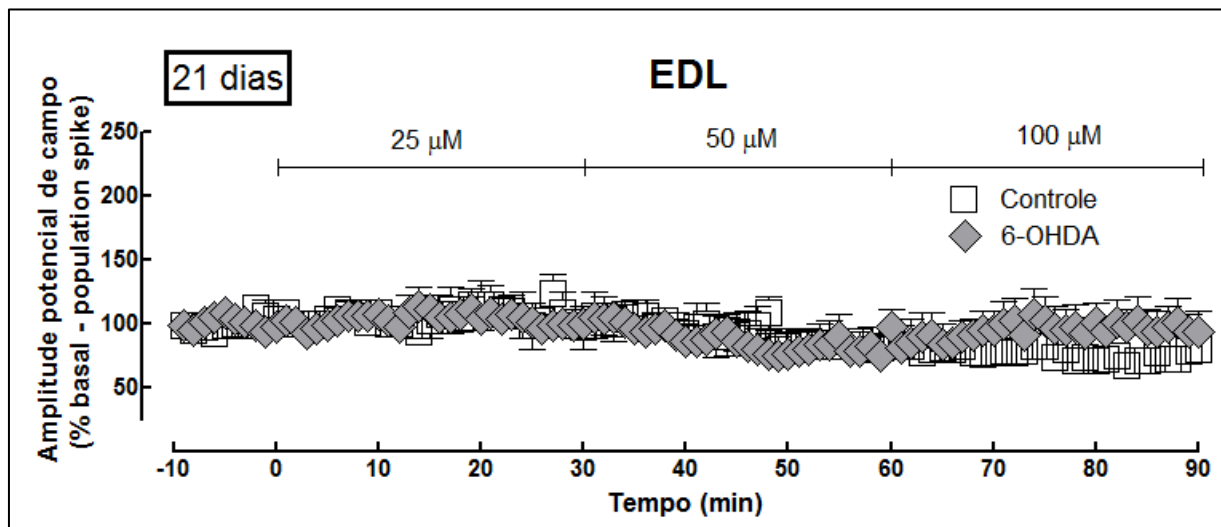


Figura 31: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 μ g/sítio) intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade à dopamina em fatias de EDL 21 dias após a injeção. Teste *t* de Student (n= 4 /grupo).

No entanto, observou-se uma diminuição da sensibilidade à dopamina seletivamente nas fatias de CPFm pré-límbico (**Fig. 32**). A perfusão com dopamina 25 μM gerou uma inibição da transmissão sináptica basal de 21 ± 6 % no grupo lesionado com 6-OHDA. Já o grupo controle apresentou uma inibição de 62 ± 5 % com essa mesma concentração de dopamina ($n=4$; $t=21,61$, $P<0,05$). A concentração de 50 μM de dopamina gerou uma inibição de 35 ± 5 % no grupo 6-OHDA e de 67 ± 7 % no grupo controle ($n = 4$; $t= 13.51$, $P <0,05$) (**Fig.32**). A concentração de 100 μM de dopamina gerou uma inibição de 51 ± 5 % no grupo 6-OHDA e de 70 ± 7 % no grupo controle ($n = 4$; $t= 13.51$, $P <0,05$) (**Fig.32**).

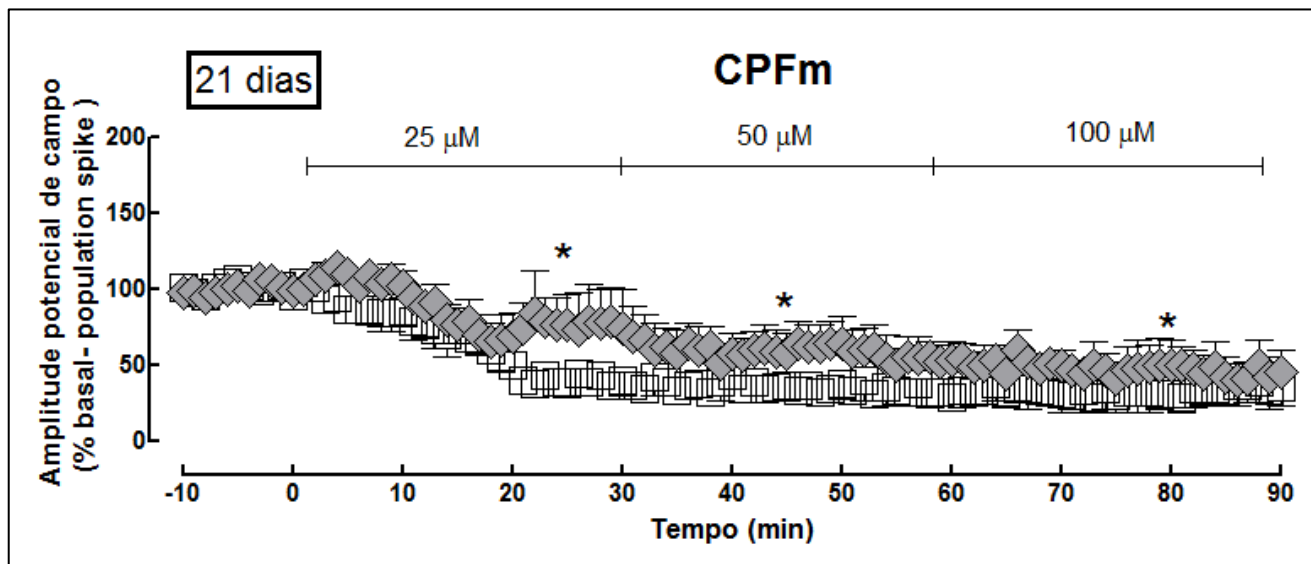


Figura 32: Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) intra-EDL sobre os registros eletrofisiológicos para o experimento de sensibilidade à dopamina em fatias de CPFm pré-límbico. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. Teste t de Student ($n = 4$ /grupo).

3.5 Discussão

Os comportamentos relacionados à anedonia foram avaliados no teste de preferência pela sacarose e no teste do esguicho. O perfil anedônico foi observado nos estágios iniciais do protocolo experimental, após 7 dias da injeção de 6-OHDA no EDL, mas não nos estágios finais (21 dias após a lesão). No entanto, as características relacionadas à depressão e ao isolamento social foram verificadas apenas no período mais tardio do protocolo, isto é, 21 dias após a injeção de 6-OHDA. Este conjunto de resultados nos permite inferir a respeito da dissociação temporal e estrutural no aparecimento de alterações relacionadas aos comportamentos anedônicos, depressivos e de isolamento social.

Alguns trabalhos já demonstraram que modelos experimentais da DP geram sintomas não motores ao longo do tempo (MATHEUS *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2010; PREDIGER *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2014; TADAIESKY *et al.*, 2008), corroborando a hipótese proposta por Braak *et al.* (2004). Esses sintomas não motores foram posteriormente relatados em trabalhos clínicos (MATSUI *et al.*, 2013; PONT-SUNYER *et al.*, 2014). No entanto, os resultados do presente estudo são inovadores em demonstrar que o comportamento de anedonia está temporalmente dissociado dos relacionados à depressão e ao isolamento social em um modelo experimental da DP.

Os sintomas não motores da DP são muito diversos, incluindo sintomas gastrointestinais, cardiovasculares, alterações no padrão do sono e sintomas neuropsiquiátricos (ERRO *et al.*, 2015). A associação entre essas diferentes esferas de sintomas não motores nos pacientes portadores da DP ainda é algo controverso. A presença de anedonia geralmente é considerada uma característica da apatia (PLUCK & BROWN, 2002) ou da depressão (LEMKE *et al.*, 2005). No entanto, essa associação entre anedonia, apatia (estado emocional de indiferença) e depressão na DP não tem sido observada em todos os estudos (FUJIWARA *et al.*, 2011; ISELLA *et al.*, 2003; LOAS, KRYSTKOWIAK & GODEFROY, 2012). Um estudo demonstrou que pacientes recém-diagnosticados com a DP e sem tratamento farmacológico apresentam apatia associada à anedonia, mas não à depressão (DUJARDIN *et al.*, 2014). Esse trabalho também evidenciou que os pacientes anedônicos possuem sintomas motores mais severos e maior prejuízo cognitivo do que os pacientes parkinsonianos sem anedonia (DUJARDIN *et al.*, 2014). Outro estudo verificou que somente

a anedonia antecipatória estava associada à apatia, a anedonia consumatória não (JORDAN *et al.*, 2013). Um estudo de caso mostrou que pacientes parkinsonianos exibem de maneira específica a anedonia consumatória, mas não a do tipo antecipatório (LOAS *et al.*, 2014).

Como pode ser observado, o cenário da associação entre anedonia e depressão na DP permanece nebuloso. Alguns estudos clínicos comprovaram essa associação (LEMKE *et al.*, 2005), enquanto outros obtiveram resultados discordantes nesse aspecto (FUJIWARA *et al.*, 2011; ISELLA *et al.*, 2003; ZAHODNE *et al.*, 2012). Evidências apontam que talvez a anedonia esteja mais relacionada à acinesia, à apatia e aos prejuízos cognitivos (SANTANGELO *et al.*, 2009). O trabalho de Spalletta *et al.* (2013) mostrou que a anedonia estaria relacionada com a depressão maior e prejuízos cognitivos. No entanto, essa relação não se manteve nos transtornos de depressão de outros tipos (transtorno de menor duração). Nesse sentido, os resultados do presente trabalho são inovadores, desvendando possíveis alterações dopaminérgicas estriatais e pré-frontais relacionadas com a dissociação temporal de comportamentos anedônicos e depressivos.

Num estudo prévio (AGRAWAL *et al.*, 1995), utilizando lesão unilateral do estriado com 6-OHDA, foi observado um aumento na taxa de ligação (*binding*) do ligante ^3H -espiperona para os receptores dopaminérgicos D2 e na taxa de ativação dos neurônios do estriado dorsal dos ratos tratados com a toxina. Isso sugere um possível aumento na sensibilidade dos receptores dopaminérgicos à dopamina após a lesão com 6-OHDA. Os resultados do presente estudo (usando um modelo de lesão bilateral com 6-OHDA) corroboram estes achados prévios, indicando que 7 dias após a lesão do EDL com 6-OHDA ocorrem aumento nos níveis de marcadores dopaminérgicos, diminuição nas respostas eletrofisiológicas e aumento na sensibilidade destas à dopamina.

Estudos prévios investigaram os efeitos da 6-OHDA no comportamento de roedores (para revisão ver: BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008; DEUMENS, BLOKLAND & PRICKAERTS, 2002). A injeção bilateral de 6-OHDA (6 µg) na SN induziu comportamentos relacionados à depressão e à anedonia em ratos (SANTIAGO *et al.*, 2014). Nesse mesmo trabalho, a diminuição nos níveis de dopamina e serotonina mostraram-se estar correlacionadas com os comportamentos anedônicos e depressivos. Como esses resultados foram observados nos tempos de 7, 14 e 21 dias após a

indução da lesão, eles apresentaram perfil temporal de expressão distinto dos resultados obtidos no presente estudo, talvez pelo sítio de injeção ter sido a SN.

Além dos efeitos relacionados ao estriado, a 6-OHDA também altera as funções de outras regiões cerebrais como o CPF (GUI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Lesões da via nigroestriatal induzidas por 6-OHDA podem alterar a funcionalidade dos neurônios corticais. Ambos os trabalhos citados acima sugeriram uma possível disfunção de receptores serotoninérgicos no CPFm. Esses dados da literatura demonstram a possível influência do sistema serotoninérgico nos efeitos observados no modelo da 6-OHDA.

A conexão entre o CPF e o estriado (via corticoestriatal) está envolvida no controle de motivação, de recompensa e de comportamentos relacionados à depressão. Essas regiões cerebrais são afetadas na depressão maior e apresentam alterações neuronais plásticas que estariam relacionadas com o surgimento dos sintomas (VOLMAN *et al.*, 2013). Pacientes com o mesmo diagnóstico clínico de depressão podem apresentar disfunções neurais de maneiras distintas. Assim, percebe-se que as necessidades de tratamento serão diferenciadas para cada caso (KRISHNAN & NESTLER, 2010). O delineamento das vias anatômicas e identificação dos sistemas de neurotransmissão que estão acometidos nesses quadros depressivos se torna imperativo devido a sua complexidade (PRICE & DREVETS, 2012; RIGA *et al.*, 2014; VOLMAN *et al.*, 2013). No entanto, o papel da dopamina nas alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas potencialmente envolvidas com os prejuízos comportamentais observados ainda não está esclarecido.

No presente estudo, investigamos as alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas nestas duas regiões do cérebro (estriado e CPF), aos 7 e aos 21 dias após a administração bilateral de 6-OHDA (10 µg/sítio). Como foi citado anteriormente, mecanismos compensatórios podem ocorrer na tentativa de manter determinadas funções estriatais. Uma série de neurotransmissores (serotonina, acetilcolina, glutamato, substância P) e de mecanismos (plasticidade neuronal) auxiliam na manutenção da densidade sináptica, mesmo quando há um processo degenerativo. Nesse ponto, nossos resultados demonstram de maneira pioneira um perfil degenerativo parcial (quantificação da TH) associado à integridade da densidade sináptica (realção estímulo-resposta), com prejuízos comportamentais relacionados à anedonia (diminuição da

preferência por sacarose e da auto-limpeza). Nos pacientes parkinsonianos pode ocorrer um perfil semelhante de sequência de eventos com relação à degeneração parcial, aparecimento de sintomas não motores e preservação das funções motoras (BRAAK *et al.*, 2004; CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006). O aparecimento das características de anedonia aos 7 dias foi associado seletivamente com um aumento nos níveis de ambos os receptores para a dopamina (D1 e D2) no corpo estriado. De maneira especulativa, podemos inferir que a injeção de 6-OHDA tenha diminuído os níveis de dopamina no EDL. Aliado a isso, podemos propor que o aumento nos níveis dos receptores dopaminérgicos observado pode constituir uma resposta compensatória do estriado na tentativa de restabelecer as funções sinápticas dopaminérgicas do sistema.

Os registros eletrofisiológicos utilizados aferiram o *tônus* dopaminérgico da preparação de fatias de EDL e de CPFm e essa resposta é dependente do funcionamento dos receptores D1 e D2 para dopamina (HAPPEL *et al.*, 2014). No experimento de estimulação de populações neuronais com pulsos pareados houve uma diminuição nas funções pré-sinápticas nas fatias de EDL. Essa resposta pode ser observada nos componentes pré-sinápticos dos sinais eletrofisiológicos aferidos. Quando o primeiro pulso é fornecido às fatias, as reservas intracelulares de cálcio são requeridas para a despolarização do neurônio. Quando o segundo pulso é aplicado na fatia, essas reservas de cálcio ainda estão no citoplasma, e mais cálcio é requerido das reservas. Assim ocorre uma somação temporal desse cálcio pré-sináptico e a resposta aferida é maior para o segundo pulso. Por isso a razão do P2/P1 é maior que 1. No EDL ocorreu um prejuízo nesse componente pré-sináptico visualizado pela diminuição da razão de P2/P1. Esse prejuízo pode estar relacionado com possíveis alterações no controle pré-sináptico da neurotransmissão dopaminérgica realizado pelos receptores D2 para dopamina. Dessa maneira, supõe-se que ocorra um favorecimento das respostas via receptores D1 para a dopamina. Associado a todos esses fatores, é importante lembrar que a sensibilidade à dopamina estava aumentada nas sinapses dopaminérgicas corticostriatais 7 dias após a injeção da toxina.

O aumento da sensibilidade à dopamina nas fatias de EDL provenientes de animais previamente injetados com 6-OHDA é um indicativo de alterações nas funções dos receptores dopaminérgicos. Em condições controle, os registros eletrofisiológicos aferidos estão

relacionados à função dopaminérgica pré-sináptica, que é controlada pelos receptores D2 para dopamina (que estão acoplados à proteína G inibitória Gi). Como citado anteriormente, os receptores D1 para dopamina estão acoplados à proteína G estimulatória (Gs) (BRUNTON, CHABNER & KNOLLMANN, 2012). Os nossos resultados indicam um aumento na amplitude do potencial de campo no EDL induzido pela lesão com 6-OHDA. Devido a isso, ocorre uma perda funcional do controle pré-sináptico dos D2R e o componente D1R pós-sináptico da resposta predomina. Isso caracterizaria o aumento na amplitude do potencial de campo.

Quando aumentou-se a concentração de dopamina (100 μ M) fornecida à preparação da fatia, observou-se uma redução na amplitude do potencial de campo. Essa resposta pode estar associada à saturação dos receptores D1R pelas concentrações menores (25 e 50 μ M) de dopamina e quando aplica-se a concentração maior ocupa-se também os receptores D2R restantes, diminuindo a amplitude do potencial de campo. No mesmo período de tempo (7 dias após a injeção de 6-OHDA) ocorrem prejuízos no componente pré-sináptico. Esses resultados são confirmados, pois 21 dias após a injeção da toxina a quantificação dos receptores está no mesmo nível do grupo controle. Associado a isso, o prejuízo pré-sináptico não é mais verificado, bem como as alterações na sensibilidade à dopamina no EDL. A quantificação dos D2R pela metodologia de Western blotting mostrou um aumento nos níveis desses 7 dias após a injeção da toxina. No entanto, não podemos afirmar que os receptores quantificados encontram-se na membrana plasmática. Em resumo, aos 7 dias observou-se alterações comportamentais relacionadas à anedonia e que estão relacionadas a prejuízos no controle pré-sináptico dopaminérgico que podem induzir às alterações na sensibilidade à dopamina. Essas respostas podem ser devido a uma falta de ação dos D2R e um excesso de ação dos D1R. Tais respostas não foram observadas 21 dias após a injeção da 6-OHDA.

Um trabalho mostrou que o aumento dos níveis dos D2R para dopamina no estriado de camundongos gerou prejuízos na motivação dos mesmos (DREW *et al.*, 2007). Os resultados do presente estudo estão de acordo com o envolvimento de alterações na sinalização dopaminérgica estriatal no comportamento motivado (DER-AVAKIAN & MARKOU, 2012; DREW *et al.*, 2007; MARCHAND, 2012; SHEPHERD, 2013).

Diante do exposto acima, alterações da função dopaminérgica do estriado podem estar associadas seletivamente com as alterações observadas nos comportamentos tipo anedonia 7 dias após a administração da 6-OHDA. Esta relação é reforçada pela observação de que houve um desaparecimento concomitante do comportamento anedônico, bem como das alterações dopaminérgicas estriatais 21 dias após a administração da neurotoxina.

Os comportamentos de isolamento social e depressivo apareceram somente 21 dias após a administração da 6-OHDA. Paralelamente a isso, as alterações neuroquímicas no CPF também só ficam evidentes nesse período do protocolo experimental. Observou-se uma redução nos níveis de DAT e uma diminuição da inibição induzida pela dopamina sobre a transmissão excitatória no CPFm. Os resultados do presente estudo estão de acordo com a participação do CPFm no controle de respostas emocionais (PRICE & DREVETS, 2012; RIGA *et al.*, 2014; VOLMAN *et al.*, 2013). Esta possível associação entre alterações no CPFm com prejuízos comportamentais relacionados com a depressão e o isolamento social é reforçada pela observação de que não foram detectadas modificações neuroquímicas e eletrofisiológicas no CPF 7 dias após a administração de 6-OHDA. Com esses resultados podemos propor que a dissociação comportamental entre anedonia, depressão e isolamento social poderia estar relacionada com alternâncias dependentes do tempo nestas duas regiões do cérebro, ou seja, no estriado (via corticoestriatal) e no CPFm, respectivamente.

Estudos anteriores observaram efeitos antidepressivos da estimulação do CPF, seja por estimulação cerebral profunda ou por estimulação transcranial em pacientes com depressão (GROSS *et al.*, 2007; KRISHNAN & NESTLER, 2010). Os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não são conhecidos. No entanto, especula-se que esses efeitos estejam relacionados com a inibição de funções neuronais nesta região. Vale lembrar que a dopamina diminuiu a transmissão sináptica basal nas fatias de CPFm do grupo controle. Os nossos resultados contribuem para o desenvolvimento do conhecimento das bases neurobiológicas associadas aos sintomas não motores da DP, mostrando que no grupo injetado com 6-OHDA ocorreu uma diminuição de sensibilidade à dopamina associada no tempo com a manifestação de comportamentos relacionados à depressão e ao isolamento social.

Uma das características do transtorno depressivo maior é a incapacidade de lidar de maneira eficaz com as frustrações e o humor

negativo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). O entendimento das vias neurais responsáveis por esses problemas de adaptação emocional ajudaria de modo importante na compreensão da fisiopatologia da depressão. Um mecanismo que está relacionado a isso é a flexibilidade comportamental (VAN AERDE & FELDMEYER, 2013). Alterações na funcionalidade do CPFm são subjacentes a essas questões e, conseqüentemente, à depressão (DUMAN & AGHAJANIAN, 2012).

Deve ser destacado que não foram observadas alterações nos experimentos de densidade sináptica e nem de plasticidade de curta duração que estariam mais relacionadas com atrofia neuronal e perda sináptica no CPFm (DUMAN & AGHAJANIAN, 2012). Entretanto, uma limitação do presente estudo é que a degeneração e redução nos níveis de dopamina no CPF dos ratos injetados com a 6-OHDA não foram avaliadas, como já foi observado em trabalhos prévios da literatura (TADAIESKY *et al.*, 2008). O que pode ser sugerido é que a ocorrência de alterações pré-sinápticas relacionadas com a diminuição nos níveis de DAT associada às alterações na sensibilidade a dopamina após 21 dias de protocolo experimental. Assim como no EDL, os registros eletrofisiológicos do CPFm estão relacionados ao *tônus* dopaminérgico e foram realizados para a observação da influência da dopamina sobre parâmetro eletrofisiológicos.

No CPFm a dopamina possui também a função de inibir o sistema glutamatérgico e controlar a ativação de vias corticais neuronais aferentes (HAPPEL *et al.*, 2014). Nas fatias de CPFm de ratos previamente injetados com 6-OHDA observou-se uma diminuição na sensibilidade à dopamina. Isso pode estar relacionado à perda do controle das funções dos D2R, que seria o componente inibitório do sistema. Assim, na resposta final, o componente dos D1R seria o prevalente. Associado a essas respostas eletrofisiológicas, os animais apresentaram nesse mesmo período de tempo (21 dias após a injeção de 6-OHDA), prejuízos comportamentais relacionados à depressão e ao isolamento social. O CPFm está envolvido com essas alterações comportamentais e a diminuição da sensibilidade à dopamina é um indício do envolvimento dopaminérgico desta região cerebral com os sintomas depressivos observados. É importante citar que a interação do CPFm com outras regiões encefálicas, como a amígdala e a área tegmentar ventral (ATV), também pode contribuir para a neurobiologia

da depressão (JOHNSTONE *et al.*, 2007; YADID & FRIEDMAN, 2008).

A ATV é um núcleo de neurônios mesencefálicos dopaminérgicos importante no cenário da depressão e da DP. Essa região se localiza próximo à SN e apresenta-se preservada em estágios precoces da DP, diferentemente da SN (BRICHTA & GREENGARD, 2014). Ativada, a ATV envia projeções diretas para o CPFm (WALSH & HAN, 2014). Em modelos animais nos quais os camundongos são susceptíveis a apresentar comportamentos relacionados à depressão, observou-se uma ativação acima do normal dos neurônios dopaminérgicos da ATV (FRIEDMAN *et al.*, 2014). A ativação optogenética fásica desses neurônios em camundongos promoveu uma susceptibilidade comportamental maior e a inibição reverteu tais características (CHAUDHURY *et al.*, 2013). Especula-se que a superativação da ATV possa aumentar a liberação de dopamina no CPFm, o que diminuiria a sensibilidade desta ao neurotransmissor. Tais efeitos poderiam explicar a diminuição da sensibilidade à dopamina no CPF observada em nosso estudo. Além disso, no presente modelo não foi observada degeneração na ATV (dados não mostrados), o que possibilita a ocorrência desta hipótese nos resultados observados ao final dos 21 dias após a injeção de 6-OHDA no EDL.

A ação do sistema dopaminérgico sobre o controle das funções comportamentais é bastante complexa, pois a atividade reduzida ou ampliada desse sistema pode gerar prejuízos funcionais (COOLS & D'ESPOSITO, 2011). O desequilíbrio do sistema dopaminérgico pode impactar sobre as funções hedônicas e também sobre outros sintomas relacionados à depressão (para revisão ver: GRACE *et al.*, 2007; YADID & FRIEDMAN, 2008). Outro ponto que adiciona complexidade a esse cenário é o processo degenerativo progressivo. Níveis variados de degeneração dopaminérgica podem causar alterações diversificadas na sinalização dopaminérgica em diferentes regiões do cérebro (DREYER, 2014).

A dopamina pode atuar de maneira bidirecional nos neurônios do CPF através de ações sobre os neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) (SEAMANS & YANG, 2004). Isso pode acontecer devido à maciça ativação dos receptores D1 e D2 para a dopamina. Os D1R estariam relacionados com redução da ação dos receptores para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Já os D2R estariam envolvidos com a redução da ação dos receptores do tipo

NMDA e também dos receptores GABA_A (SEAMANS & YANG, 2004). Os efeitos observados no experimento de sensibilidade à dopamina sugerem que o nosso modelo experimental induziu alterações possivelmente relacionadas com a funcionalidade dos receptores dopaminérgicos D1 e D2. Especula-se que isso possa estar relacionado aos receptores NMDA e GABA_A, visto que os receptores dopaminérgicos podem interagir, tanto direta quanto indiretamente, com esses receptores. Vale ressaltar que esse cenário está de acordo com alguns estudos clínicos que sugerem um envolvimento dissociado de diferentes áreas do cérebro com relação aos sintomas de anedonia e depressão em pacientes com a DP (LEMKE *et al.*, 2005; STARKSTEIN, 2011).

3.6 Conclusões

Em conjunto, os resultados deste capítulo fornecem evidências pioneiras de uma dissociação temporal e estrutural das funções de estriado e do CPFm relacionadas com diferentes prejuízos comportamentais envolvidos com sintomas não motores em ratos lesionados com a 6-OHDA. Os prejuízos comportamentais relacionados à anedonia foram observados somente 7 dias após a injeção da toxina. Essas diferenças ocorreram quando os níveis de receptores dopaminérgicos também estavam alterados no estriado. Essas características se relacionam a uma diminuição da sensibilidade à dopamina nas fatias estriatais.

Com relação às alterações comportamentais relacionadas à depressão observou-se uma associação com a diminuição da sensibilidade à dopamina no CPFm. Esses prejuízos foram observados somente 21 dias após a indução da lesão. Em resumo, estas modificações comportamentais são acompanhadas por flutuações temporais nos níveis de receptores dopaminérgicos que conduzem a alterações no controle pré-sináptico e também na sensibilidade do sistema dopaminérgico no estriado e no CPFm. Estes resultados trazem informações novas sobre a base neurobiológica subjacente à dissociação de anedonia e depressão na DP com o envolvimento da dopamina. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos exatos destas condições ainda precisam ser esclarecidos.

4 Capítulo 4

Tratamentos farmacológicos para os sinais anedônicos e depressivos induzidos por um modelo experimental para a doença de Parkinson

4.1 Introdução

O tratamento farmacológico preconizado para a DP é baseado no restabelecimento as funções dopaminérgicas, seja através da administração de L-Dopa ou de agonistas dos receptores dopaminérgicos. Apesar de serem tratamentos paliativos, estes são eficazes principalmente em tratar os sintomas motores (CONNOLLY & LANG, 2014). No entanto, a L-Dopa não reverte os sintomas de depressão e até mesmo, em alguns casos pode piorar o quadro depressivo (CHOI *et al.*, 2000). Esse perfil pode estar relacionado à conversão da L-Dopa em dopamina nos neurônios serotoninérgicos, o que pode diminuir a síntese de serotonina (BORAH & MOHANAKUMAR, 2007). Os agonistas dos receptores dopaminérgicos demonstram alguns efeitos antidepressivos tanto em pacientes portadores da DP (GOETZ, 2010; LEMKE, 2008; MIYASAKI *et al.*, 2006). Por exemplo, o pramipexol, agonista dos receptores D2 para dopamina, apresenta efeito antidepressivo em pacientes parkinsonianos (BARONE *et al.*, 2010) quanto em pacientes sem DP (ZARATE *et al.*, 2004).

A adequação da utilização de antidepressivos de diferentes classes para o tratamento da depressão na DP ainda não está totalmente estabelecida. Os ISRSs e os antidepressivos tricíclicos (ADT) são as classes mais comumente prescritas (ALTHAUS *et al.*, 2008). No entanto, a sua eficácia no tratamento da depressão em pacientes parkinsonianos ainda precisa ser melhor comprovada. Em 2013, uma revisão sistemática realizou uma meta-análise na qual avaliou diversos trabalhos clínicos, e selecionou somente os seis *trials* clínicos sobre o uso de antidepressivos em pacientes portadores da DP que eram randomizados duplo-cego (ROCHA *et al.*, 2013). Os antidepressivos avaliados foram: sertralina, citalopram e paroxetina (ISRSs), venlafaxina (inibidor da recaptação da serotonina e da noradrenalina - IRSN) e os ADTs desipramina e nortriptilina (que inibem a recaptação de noradrenalina e serotonina). O estudo concluiu que os antidepressivos estudados podem ser eficazes no tratamento da depressão na DP. No entanto, a inconsistência dos resultados reforça a necessidade de estudos multicêntricos em longo prazo para avaliar mais classes de antidepressivos e seus graus de eficácia e tolerabilidade. Nesse aspecto, faltam evidências convincentes, pois poucos estudos duplo-cego ou *trials* controlados com placebo foram realizados até o momento.

Os ISRSs possuem baixa afinidade pelos transportadores de noradrenalina, sendo mais seletivos para os transportadores de serotonina (STAHL, 1998). Os ISRS induzem uma quantidade menor de efeitos colaterais que os ADT e por isso são mais utilizados na DP. No entanto, os ADT apresentam efeitos satisfatórios no tratamento da depressão na DP. Além disso, os ISRSs possuem baixa afinidade para receptores adrenérgicos e colinérgicos, o que aumenta sua segurança e tolerabilidade. São também bem tolerados por pacientes idosos que geralmente são polimedicados (SEPPI *et al.*, 2011). No entanto, os estudos que abordaram a utilização dos ISRSs na DP apontam para resultados discrepantes. Alguns trabalhos mostraram benefícios (DEVOS *et al.*, 2008; PALHAGEN *et al.*, 2009; RAMPELLO *et al.*, 2002), enquanto outros não apresentam efeitos significativos do tratamento antidepressivo (LEENTJENS *et al.*, 2003c; MENZA *et al.*, 2009).

Alguns estudos já avaliaram a eficácia do pramipexol (agonista dopaminérgico dos receptores D2 e D3) no tratamento da depressão na DP. Rektorová *et al.* (2003) demonstraram efeitos benéficos do pramipexol nos sintomas depressivos e motores em portadores da DP. Em 2006, um trabalho comparou a eficácia do tratamento antidepressivo com sertralina e com pramipexol (BARONE *et al.*, 2006). Esse estudo randomizado investigou, durante 14 semanas, quais seriam os efeitos desses tratamentos em pacientes portadores da DP que não apresentavam complicações motoras. Isso é importante pois, como mencionado anteriormente, o quadro depressivo pode estar ou não associado ao comprometimento motor. Esse trabalho demonstrou melhores efeitos antidepressivos e menores efeitos adversos do pramipexol quando comparado à sertralina. Um estudo duplo-cego, controle-placebo e conduzido durante 12 semanas evidenciou que o pramipexol possui efeitos antidepressivos em pacientes parkinsonianos (BARONE *et al.*, 2010). Sendo assim, observa-se que os agonistas dos receptores D2 para a dopamina podem ser candidatos promissores para o tratamento da depressão na DP. Ressalta-se que essa classe de fármacos também é utilizada no tratamento dos sintomas motores da DP. Assim, é importante vislumbrar uma possível associação de ações farmacológicas dessa classe de fármacos.

A bupropiona é um inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina. É eficaz no tratamento da depressão, assim como de outras condições como o déficit de atenção e a hiperatividade (STAHL

et al., 2004; MANEETON *et al.*, 2011). Por possuir uma ação menor sobre o sistema serotoninérgico, a bupropiona apresenta menor propensão em causar ganho de peso e disfunções na atividade sexual (STAHL *et al.*, 2004). Devido à sua ação sobre a neurotransmissão dopaminérgica, a bupropiona se torna um fármaco de interesse para o tratamento da depressão na DP (RASKIN & DURST, 2010; COSTA *et al.*, 2012). No entanto, ainda é necessária a realização de estudos clínicos randomizados e pré-clínicos para a confirmação da efetividade da bupropiona no tratamento da depressão na DP.

Um fato alarmante é que uma proporção grande de pacientes deprimidos portadores da DP não recebe qualquer tratamento antidepressivo. Apesar da relevância da depressão na DP ser cada vez mais reconhecida, esse quadro ainda é subdiagnosticado e, consequentemente, subtratado (NAZEM *et al.*, 2008; NÈGRE-PAGÈS *et al.*, 2010; REICHMANN, SCHNEIDER & LÖHLE, 2009). De maneira geral, os sintomas depressivos na DP podem ser tratados com eficácia por meio de ISRSs, IRSN, bupropiona e agonistas dopaminérgicos. No entanto, estes medicamentos não são tratamentos padronizados para esses pacientes e nem todos respondem bem à terapia medicamentosa. Também é importante salientar que intervenções não farmacológicas podem ser realizadas como adjuvantes no tratamento da depressão na DP, como a terapia-cognitivo comportamental, a estimulação magnética transcranial e a estimulação cerebral profunda (ERRO *et al.*, 2015). Dessa maneira, torna-se imperativo entender os efeitos do tratamento com antidepressivos e com um agonista D2R em sintomas anedônicos e depressivos na DP.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos do tratamento com fluoxetina (ISRS), bupropiona (IRDN) ou quinpirole (agonista D2R) durante 7 dias sobre os comportamentos relacionados à anedonia observados no modelo experimental da 6-OHDA;
- Investigar os efeitos do tratamento crônico com fluoxetina (ISRS), bupropiona (IRDN) ou quinpirole (agonista D2R) durante 21 dias sobre os comportamentos relacionados à depressão e isolamento social observados no modelo experimental da 6-OHDA.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Drogas

Hidrocloridrato de Fluoxetina (Sigma-Aldrich, EUA), hidrocloridrato de bupropiona (Sigma-Aldrich, EUA) e hidrocloridrato de quinpirole (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em solução salina (10 mg/ml, 10 mg/ml, 0,1 mg/ml, respectivamente) e as doses utilizadas foram selecionadas com base em estudos prévios da literatura (CRYAN & LUCKI, 2000; LOPEZ-RUBALCAVA & LUCKI, 2000; YAMADA *et al.*, 2013).

4.3.2 Tratamentos

As drogas foram administradas por via i.p. nas doses de: fluoxetina (10 mg/kg), bupropiona (10 mg/kg) e quinpirole (0,1 mg/kg). Os animais foram tratados uma vez ao dia durante 7 ou 21 dias a partir do primeiro dia após a injeção de 6-OHDA. O grupo controle recebeu a administração i.p. de NaCl (0,9%) durante os mesmos períodos.

4.3.3 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. As variáveis independentes utilizadas foram a lesão (controle/veículo ou lesionado com 6-OHDA 10 µg/sítio) e tratamento (controle, bupropiona, fluoxetina ou quinpirole). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (EPM), e o nível de significância aceito como indicativo de diferenças significativas foi $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o *software* Statistica 7®.

4.3.4 Protocolo experimental

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica bilateral para a injeção de 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no EDL (**Fig. 32**). Os animais foram tratados com fluoxetina, bupropiona ou quinpirole uma vez por dia por via intraperitoneal. O tratamento farmacológico foi iniciado 24

horas após a lesão com 6-OHDA. Após 7 ou 21 dias, grupos independentes de animais foram testados nas tarefas comportamentais não motoras, tais como preferência por sacarose e esguicho (anedonia), teste do nado forçado (depressão), o teste de interação social (para avaliar o isolamento social).

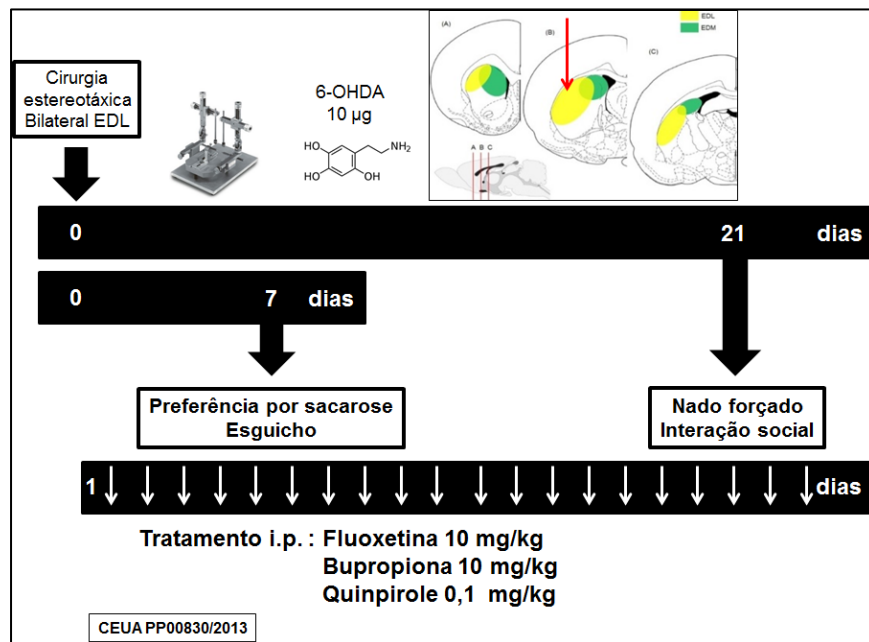


Figura 33: Protocolo experimental para a realização dos tratamentos farmacológicos. Ratos Wistar machos com 3 meses de idade foram submetidos a cirurgia estereotáxica bilateral para a injeção bilateral de 6-OHDA na dose de 10 µg/hemisfério no EDL. Após 7 ou 21 dias, os grupos independentes de animais foram testados em tarefas comportamentais descritas acima. Os animais foram tratados com as drogas citadas acima durante 7 ou 21 dias. Setas brancas indicam as injeções diárias.

4.4 Resultados

4.4.1 Os tratamentos com bupropiona, fluoxetina e quinpirole durante sete dias previnem os comportamentos relacionados à anedonia induzidos pela 6-OHDA

Foi avaliado se a anedonia induzida pela 6-OHDA observada tanto no teste de preferência por sacarose quanto no teste do esguicho após 7 dias seria prevenida pelo tratamento com bupropiona ou fluoxetina (10 mg/kg, i.p., durante 7 dias). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator lesão ($F_{(2,26)} = 3,87$, $P < 0,05$) e da interação entre os fatores lesão e tratamento ($F_{(2,26)} = 8,86$, $P < 0,05$) no teste da preferência por sacarose para o tratamento com bupropiona (**Fig. 34A**). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o tratamento com bupropiona foi capaz de reverter os prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA. Para o tratamento com a fluoxetina, a ANOVA de duas vias não evidenciou efeito significativo para nenhum fator no teste da preferência por sacarose (**Fig. 34B**). Quando se avaliou os efeitos do tratamento com quinpirole (0,1 mg/kg, i.p., durante 7 dias), a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator lesão ($F_{(1,27)} = 5,73$, $P < 0,05$) no teste da preferência por sacarose (**Fig. 34C**). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o tratamento com quinpirole foi capaz de reverter os prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA.

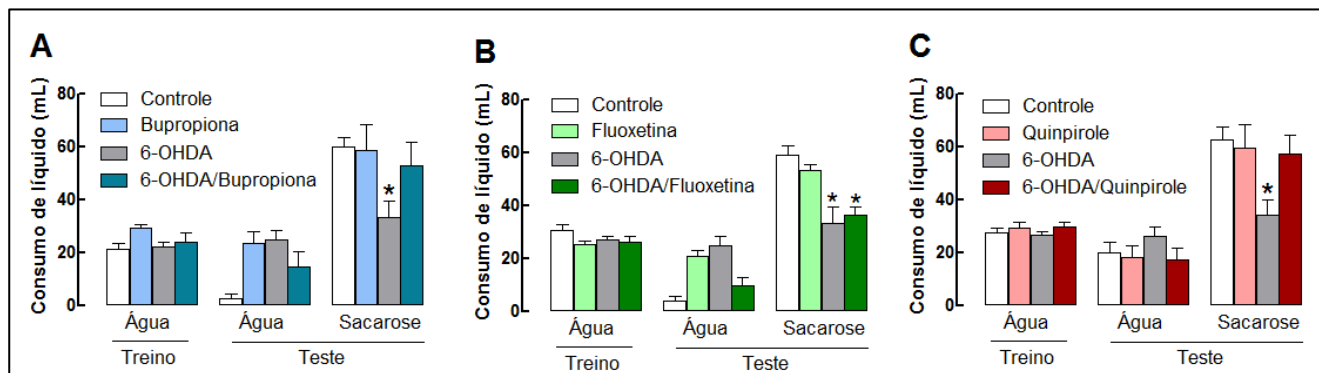


Figura 34: Avaliação dos efeitos do tratamento com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole sobre os comportamentos relacionados à anedonia observados no teste da preferência por sacarose 7 dias após a injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no estriado dorso lateral (EDL). Efeitos sobre o consumo de líquido dos tratamentos por 7 dias com (A) bupropiona (10 mg/kg, i.p.), (B) fluoxetina (10 mg/kg, i.p.), (C) quinpirole (0,1 mg/kg, i.p.). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA. ANOVA de duas vias seguida *post-hoc* de Newman-Keuls (n= 8-10 /grupo).

No teste do esguicho a análise estatística demonstrou efeito significativo do tratamento com bupropiona ($F_{(1,26)}=62,52$, $P<0,05$) e do fator interação lesão e tratamento ($F_{(1, 26)} = 10,43$ $P <0,05$) (**Fig. 35A**). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o tratamento com bupropiona foi capaz de reverter os prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA. Para o tratamento com a fluoxetina, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo para o fator tratamento no teste do esguicho ($F_{(1,28)} = 46,39$, $P <0,05$) (**Fig. 35B**). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o tratamento com fluoxetina foi capaz de reverter a redução no tempo de autolimpeza induzido pela injeção de 6-OHDA no teste do esguicho. Quando se avaliou os efeitos do tratamento com quinpirole (0,1 mg/kg, i.p., durante 7 dias), a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator lesão no teste do esguicho , ($F_{(1,29)}= 9,04$, $P<0,05$) (**Fig. 35C**). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o tratamento com quinpirole foi capaz de reverter os prejuízos induzidos pela injeção de 6-OHDA.

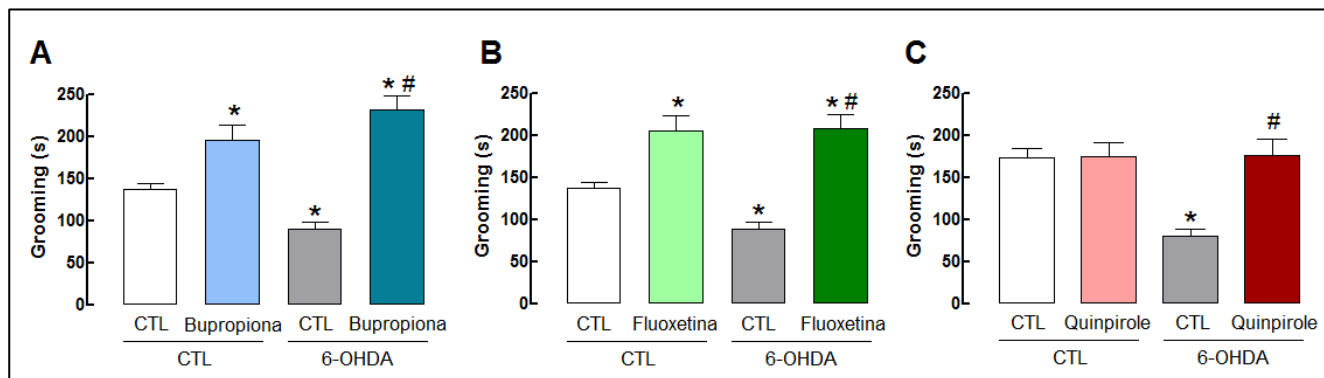


Figura 35: Avaliação dos efeitos do tratamento com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole sobre os comportamentos relacionados à anedonia observados no teste do esguicho 7 dias após a injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no estriado dorso lateral (EDL). Efeitos sobre o tempo de autolimpeza no teste do esguicho dos tratamentos por 7 dias com (A) bupropiona (10 mg/kg, i.p.), (B) fluoxetina (10 mg/kg, i.p.), (C) quinpirole (0,1 mg/kg, i.p.). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA. ANOVA de duas vias seguida *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8-10$ /grupo).

4.4.2 Os tratamentos com bupropiona, fluoxetina e quinpirole durante 21 dias previnem os comportamentos relacionados à depressão e isolamento social induzidos pela 6-OHDA

Os comportamentos relacionados à depressão e de isolamento social induzidos pela injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/sítio) foram observados após 21 dias no teste do nado forçado e da interação social, respectivamente. Dessa maneira, realizou-se um tratamento crônico durante 21 dias com as drogas fluoxetina (10 mg/kg, i.p.), bupropiona (10 mg/kg, i.p.) ou quinpirole (0,1 mg/kg, i.p.). Para o tratamento crônico com bupropiona no teste do nado forçado, a ANOVA de duas vias demonstrou efeitos significantes para os fatores lesão ($F_{(1,28)} = 6,74$, $P < 0,05$) e tratamento ($F_{(1,28)} = 18,05$, $P < 0,05$) no parâmetro da imobilidade. No parâmetro de tempo de nado a análise estatística revelou efeitos significantes para o fator lesão ($F_{(1,28)} = 7,62$, $P < 0,05$) e interação entre lesão e tratamento ($F_{(1,28)} = 3,77$, $P < 0,05$). Quando se avaliou o tempo de escalada a ANOVA indicou efeitos significantes para os fatores lesão ($F_{(1,28)} = 116,41$, $P < 0,05$), tratamento ($F_{(1,28)} = 39,10$, $P < 0,05$) e de interação entre ambos ($F_{(1,28)} = 9,34$, $P < 0,05$). Para o teste de interação social a ANOVA demonstrou efeito do fator lesão ($F_{(1,26)} = 48,36$, $P < 0,05$) e efeito da interação entre os fatores lesão e tratamento com bupropiona ($F_{(1,26)} = 8,40$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento crônico com bupropiona atenuou o surgimento das alterações nos parâmetros de: tempo de imobilidade (**Fig. 36A**), tempo de nado (**Fig. 36B**), tempo de escalada (**Fig. 36C**) e tempo total de investigação (**Fig. 36D**).

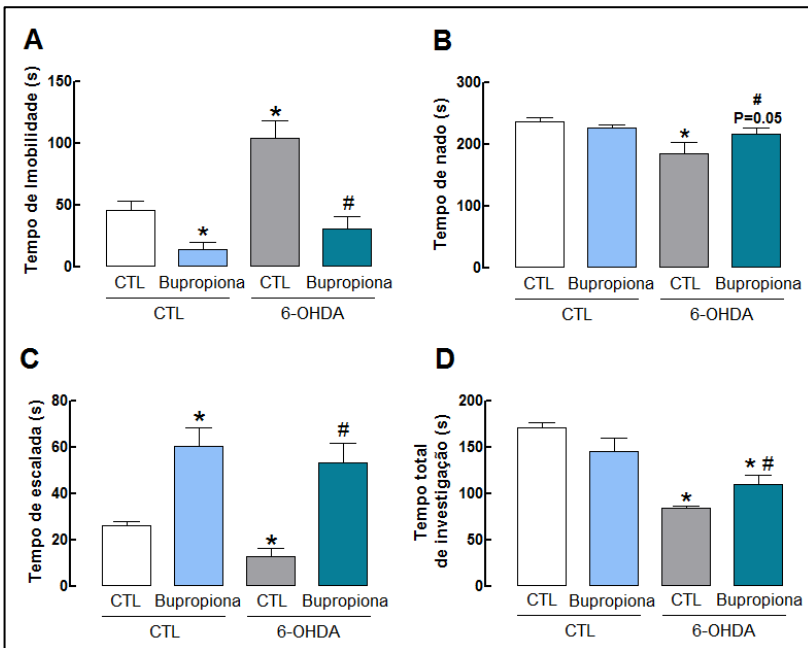


Figura 36: Efeitos do tratamento com bupropiona durante 21 dias sobre os prejuízos induzidos pela injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/sítio) intra-EDL sobre comportamentos relacionados à depressão e isolamento social. (a) Tempo de imobilidade, (b) Tempo de nado, (c) Tempo de escalada no teste do nado forçado; (d) Tempo total de interação social no teste da interação social. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle, # $P < 0.05$ comparado ao grupo 6-OHDA. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. (n= 8/grupo).

Para o tratamento crônico com fluoxetina no teste do nado forçado, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os fatores lesão ($F_{(1,27)} = 16,24$, $P < 0,05$) e tratamento ($F_{(1,27)} = 19,84$, $P < 0,05$) no parâmetro da imobilidade. No parâmetro de tempo de nado, a análise estatística revelou efeitos significantes para os fatores tratamento ($F_{(1,27)} = 21,88$, $P < 0,05$) e interação lesão vs. tratamento ($F_{(1,27)} = 6,72$, $P < 0,05$). Quando se avaliou o tempo de escalada, a ANOVA indicou um efeito significativo para o fator lesão ($F_{(1,27)} = 8,25$, $P < 0,05$). Para o teste de interação social, a ANOVA indicou um efeito significativo do fator lesão ($F_{(1,26)} = 33,20$, $P < 0,05$) e da interação entre os

fatores lesão e tratamento com fluoxetina ($F_{(1,26)} = 16,03$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tratamento crônico com fluoxetina preveniu o surgimento das alterações nos parâmetros de: tempo de imobilidade (**Fig. 37A**), tempo de nado (**Fig. 37B**), tempo de escalada (**Fig. 37C**) e tempo total de investigação (**Fig. 37D**).

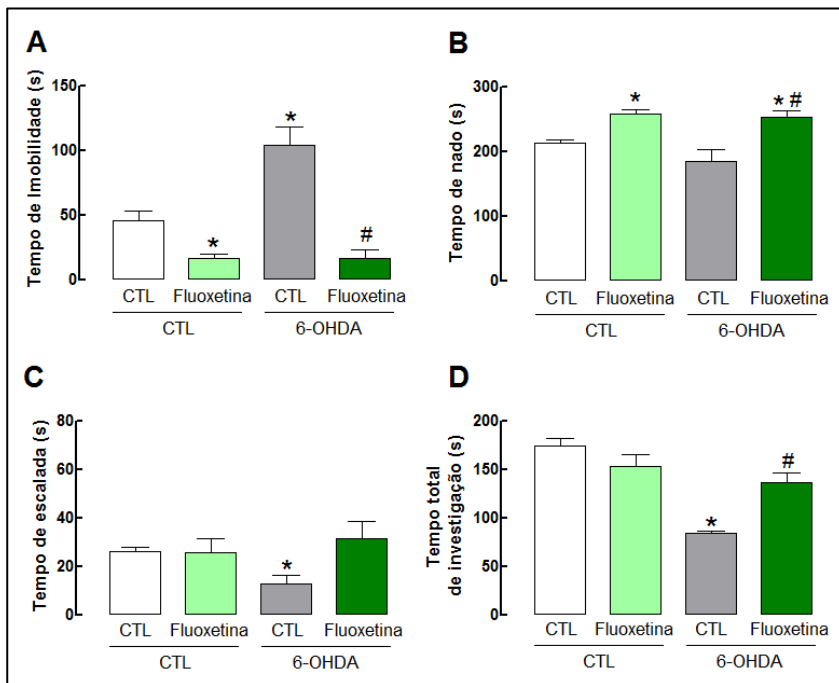


Figura 37: Efeitos do tratamento com fluoxetina durante 21 dias sobre os prejuízos induzidos pela injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) intra-EDL sobre comportamentos relacionados à depressão. (a) Tempo de imobilidade, (b) Tempo de nado, (c) Tempo de escalada no teste do nado forçado; (d) Tempo total de interação social no teste da interação social. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8/\text{grupo}$).

Para o tratamento crônico com quinpirole no teste do nado forçado, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os fatores tratamento ($F_{(1,28)} = 17,80$, $P < 0,05$) e interação lesão vs. tratamento ($F_{(1,28)} = 8,52$, $P < 0,05$) no parâmetro da imobilidade. No

parâmetro de tempo de nado, a análise estatística revelou um efeito significativo para o fator lesão ($F_{(1,28)} = 6,02$, $P < 0,05$). Quando se avaliou o tempo de escalada, a ANOVA indicou efeitos significantes para os fatores tratamento ($F_{(1,28)} = 220,46$, $P < 0,05$) e interação ($F_{(1,28)} = 10,668$, $P < 0,05$). No teste de interação social, a ANOVA indicou um efeito significativo do fator lesão ($F_{(1,22)} = 106,20$, $P < 0,05$) e da interação entre os fatores lesão e tratamento com quinpirole ($F_{(1,22)} = 10,09$, $P < 0,05$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tratamento crônico com quinpirole preveniu o surgimento das alterações nos parâmetros de: tempo de imobilidade (**Fig. 38A**), tempo de escalada (**Fig. 38C**) e tempo total de investigação (**Fig. 38D**), mas não o tempo de nado (**Fig. 38B**).

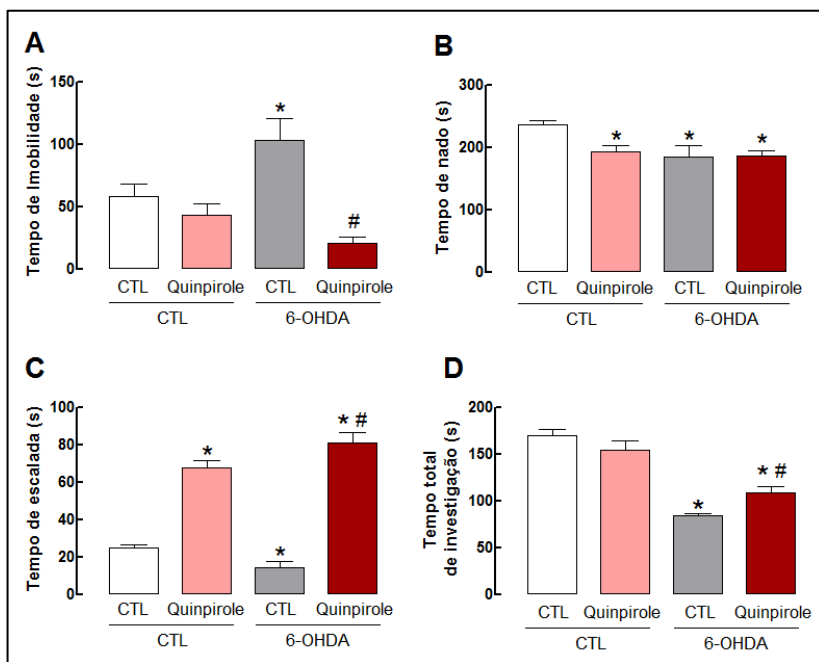


Figura 38: Efeitos do tratamento com quinpirole durante 21 dias sobre os prejuízos induzidos pela injeção bilateral de 6-OHDA (10 $\mu\text{g/sítio}$) intra-EDL sobre os comportamentos relacionados à depressão. (a) Tempo de imobilidade, (b) Tempo de nado, (c) Tempo de escalada no teste do nado forçado; (d) Tempo total de interação social no teste da interação social. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo 6-OHDA. ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($n = 8/\text{grupo}$).

4.5 Discussão

Os tratamentos crônicos com dois antidepressivos (bupropiona e fluoxetina) e com um agonista dopaminérgico dos receptores D2 (quinpirole) preveniram o aparecimento de alterações comportamentais relacionadas com sinais anedônicos, depressivos e de isolamento social. Além disso, esses resultados também representam uma importante validação farmacológica destas alterações que podem estar relacionadas a comportamentos associados com a anedonia, depressão e isolamento social observados nesse modelo experimental da DP (CONNOLLY & FOX, 2014; LEMKE, 2008). O tratamento com bupropiona, fluoxetina ou quinpirole e a lesão com 6-OHDA não alteraram o consumo de água durante o primeiro dia do teste de preferência por sacarose. Isso indica que os efeitos observados são relacionados seletivamente às funções hedônicas e não a uma supressão do comportamento dipsogênico.

A bupropiona é um antidepressivo que atua na inibição da recaptação da dopamina e da noradrenalina. Esse mecanismo de ação melhora a transmissão destas catecolaminas e difere daqueles (STAHL *et al.*, 2004). No presente trabalho, o tratamento realizado durante 7 dias com a bupropiona foi capaz de prevenir o aparecimento das características relacionadas à anedonia no teste da preferência por sacarose e no teste do esguicho. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de CARVALHO *et al.* (2013), no qual a mesma dose de bupropiona preveniu o aparecimento dos prejuízos anedônicos induzidos pela 6-OHDA no teste da preferência por sacarose. No entanto, aquele estudo não avaliou o efeito do tratamento com bupropiona no teste do nado forçado, uma vez que esse perfil já havia sido avaliado em outros estudos, nos quais foi demonstrado efeito preditivo antidepressivo da bupropiona nessa mesma dose (para revisão CRYAN, VALENTINO & LUCKY, 2005). Os nossos resultados mostram que o tratamento com bupropiona foi capaz de restaurar as funções hedônicas dos animais. Além disso, o tratamento crônico com bupropiona preveniu os déficits no teste do nado forçado e atenuou a redução na interação social dos animais lesionados com 6-OHDA. Deve ser destacado que nenhum outro estudo investigou os efeitos da bupropiona sobre os parâmetros do teste do nado forçado e da interação social no modelo experimental da 6-OHDA. Por outro lado, embora alguns trabalhos tenham avaliado a utilização da bupropiona para tratar os quadros depressivos em pacientes portadores da DP (COSTA *et al.*,

2012; RASKIN & DURST, 2010; ZAŁUSKA & DYDUCH, 2011), ainda não há comprovação satisfatória da eficácia e segurança da bupropiona para os pacientes parkinsonianos.

O efeito anti-anedônico da fluoxetina já foi demonstrado experimentalmente em modelo de estresse crônico (D'ÁQUILA *et al.*, 1997). Nesse estudo, os autores observaram efeitos do tratamento com fluoxetina sobre parâmetros do consumo de sacarose e avaliaram também os efeitos da flibanserina, um agonista do receptor 5-HT_{1A} e antagonista do receptor 5-HT₂, para serotonina. No presente estudo, o tratamento realizado durante 7 dias com a fluoxetina foi capaz de prevenir o aparecimento das características relacionadas à anedonia no teste do esguicho, mas não no teste de preferência por sacarose. Essa ausência de efeito observada em nossos resultados de preferência por sacarose pode estar relacionada ao curto período de tempo em que a fluoxetina foi administrada (7 dias). Um outro estudo também não observou efeitos do tratamento durante 14 dias com fluoxetina (10 mg/kg) sobre o parâmetro de preferência por sacarose para reverter comportamentos anedônicos em ratos bulbomectomizados (modelo experimental que induz características relacionadas a comportamentos anedônicos e tipo desamparo e de isolamento social) (GUPTA *et al.*, 2014).

Alguns estudos mostraram que as respostas aos antidepressivos ISRS parecem depender, em parte, dos processos de neurogênese que ocorrem no giro denteado do hipocampo e que necessitam de tratamento crônico para que estas alterações ocorram (SAHAY & HEN, 2007). Trabalhos evidenciaram que o tratamento crônico com fluoxetina aumenta a neurogênese nessa região cerebral de roedores e humanos (SANTARELLI *et al.*, 2003; SAHAY & HEN, 2007). Devido a isso, sugere-se que os efeitos terapêuticos da fluoxetina, assim como de outros antidepressivos, dependam de processos de neurogênese associados ao tratamento crônico (GREENE *et al.*, 2009; MALBERG *et al.*, 2000; SAHAY & HEN, 2007; SANTARELLI *et al.*, 2003; KHEIRBEK & HEN, 2011; SACHS & CARON, 2015).

O protocolo de administração crônica (durante 21 dias) da fluoxetina mostrou efeitos antidepressivos em ambos os testes realizados. No teste do nado forçado o tratamento crônico preveniu os prejuízos nos três parâmetros avaliados. No teste da interação social a fluoxetina preveniu totalmente os prejuízos induzidos pela 6-OHDA nos comportamentos de interação social. Um estudo mostrou que no modelo

experimental da 6-OHDA injetada na SN induziu diminuição na proliferação celular na zona subgranular do hipocampo(SUZUKI *et al.*, 2010). Além disso, observaram que o tratamento durante 14 dias com a fluoxetina reverteu essa diminuição na proliferação celular, mas o trabalho não avaliou comportamentos relacionados à depressão.

Miguel *et al.* (2013) mostraram que o tratamento com a L-dopa modificou o efeito antidepressivo da fluoxetina (ISRS) e da reboxetina (inibidor da recaptação de noradrenalina IRN) em ratos. Esse estudo mostrou que a L-dopa não alterou a atividade neuronal basal no *locus coeruleus* e nos núcleos da rafe, e não modificou os comportamentos no teste do nado forçado. No entanto, o tratamento com L-dopa melhorou a resposta neuronal do *locus coeruleus* à reboxetina e reduziu a resposta dos núcleos da rafe à fluoxetina. Além disso, a L-dopa diminuiu os efeitos antidepressivos da fluoxetina. Dessa forma, a L-dopa modifica de maneira oposta os efeitos antidepressivos da reboxetina e fluoxetina. Os resultados daquele estudo confirmam a importância da cautela na prescrição de tratamento antidepressivo na DP, e também ressaltam que outras abordagens terapêuticas sejam consideradas, como a da utilização dos agonistas dopaminérgicos.

Um trabalho recente investigou os efeitos antidepressivos da imipramina (ADT, IRSN), da fluoxetina (ISRS) e do pramipexol (agonista dos D2R/D3R para dopamina) no modelo experimental da 6-OHDA injetada no estriado ventral em ratos (BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA *et al.*, 2014). Nesse estudo, a 6-OHDA aumentou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e diminuiu a quantidade de dopamina no estriado e no CPF. No entanto, a fluoxetina e a imipramina não apresentaram respostas antidepressivas. Um motivo para essa ausência de efeito seria o tempo de tratamento com essas drogas que foi de 13 dias. Somente o pramipexol foi capaz de reverter esses efeitos da 6-OHDA após 13 dias de tratamento. Em vista dos resultados, os agonistas dopaminérgicos D2R/D3R se apresentam como estratégias promissoras para o tratamento de sintomas anedônicos e depressivos nos pacientes portadores da DP.

O tratamento crônico com quinpirole (doses acima de 0,56 mg/kg) pode aumentar o consumo de líquido em roedores, na forma de soluções contendo tanto sacarose quanto etanol (CIOLI, CARICATI & NENCINI, 1999). No entanto, nossos resultados não sofreram essa interferência, visto que, a dose de quinpirole utilizada foi cinco vezes menor do que as usadas para a hiperdipsia. Além disso, durante a fase de

treino não ocorreram diferenças significativas quanto ao consumo de líquido, e na fase de teste o consumo de sacarose estava na mesma magnitude do grupo controle.

O quinpirole mostrou efeitos antidepressivos mediados por receptores D2 para dopamina no teste do nado forçado quando administrado de maneira subcrônica (3 administrações 24, 5 e 1 h antes do teste) (BASSO *et al.*, 2005). Outro estudo demonstrou que o efeito antidepressivo observado no teste do nado forçado em ratos estava relacionado com a ativação dos receptores D2 (BORSINI *et al.*, 1988). Outro agonista dopaminérgico que possui efeitos antidepressivos no teste do nado forçado é o pramipexol (MAJ *et al.*, 1997). Essa substância é um agonista dos receptores da subfamília D2 (com afinidade preferencial para os receptores D3 em comparação aos receptores D2 e D4). Outro trabalho mostrou que o biperidil e o quinpirole apresentaram efeitos antidepressivos no teste do nado forçado em camundongos (BROCCO *et al.*, 2006). Mostrou-se também que esses efeitos eram promovidos via receptores D2 para dopamina, enquanto que antagonistas seletivos para os receptores D3 não foram efetivos em bloquear tais respostas.

Um efeito que já foi observado com o tratamento com fluoxetina, bupropiona ou quinpirole é a neuroproteção (LI *et al.*, 2000; SANTOS, 2012; SAWADA *et al.*, 1998). Na revisão de Li e colaboradores (2000) foi abordado o efeito neuroprotetor de diversas substâncias perante modelos experimentais de DP. Os efeitos da fluoxetina parecem estar relacionados à neurogênese (SANTOS, 2012). A bupropiona evidenciou efeito neuroprotetor em cultura de células PC12 com relação a aumentar o RNAm da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD1) (LI *et al.*, 2000). Já o tratamento com quinpirole mostrou efeito neuroprotetor perante neurotoxicidade induzida pelo glutamato em cultura de células mesencefálicas (SAWADA *et al.*, 1998). Esses resultados positivos necessitam ser replicados em modelos experimentais da DP e corroborados por ensaios clínicos. Os efeitos observados no presente estudo com os tratamentos com essas substâncias podem estar relacionados com suas funções possivelmente neuroprotetoras. No entanto, é importante destacar que aos 7 dias, a fluoxetina apresentou efeitos somente em um dos testes, e que os tratamentos crônicos com a bupropiona e o quinpirole não reverteram totalmente os efeitos da 6-OHDA no teste de interação social aos 21 dias.

O quadro parece promissor quanto aos estudos clínicos envolvendo antidepressivos clássicos e agonistas dopaminérgicos na depressão relacionada à DP. No entanto, são ainda necessários muitos avanços no entendimento dos mecanismos implícitos em seus efeitos perante essa patologia. Estudos clínicos sem a utilização de controle placebo demonstraram melhora nos quadros depressivos de pacientes parkinsonianos com o uso do citalopram (ISRS), sem o desenvolvimento de alterações na função motora (DELL'AGNELLO *et al.*, 2001; MENZA *et al.*, 2004; PALHAGEN *et al.*, 2009). A paroxetina (ISRS) foi avaliada em um estudo com controle placebo e não demonstrou melhora significativa na depressão dos pacientes com DP (MENZA *et al.*, 2009). Esse fármaco também foi avaliado em estudos abertos. Juntamente com sua utilização, foi observada diminuição dos sintomas depressivos dos portadores de DP, quando comparado ao seu nível basal e sem alterações nos prejuízos de funções motoras (CERAVOLO *et al.*, 2000; TESEI *et al.*, 2000).

A sertralina (ISRS) já foi avaliada em uma série de estudos sem controle placebo, que mostrou efeitos antidepressivos, sem alteração das funções motoras nos pacientes portadores de DP (ANTONINI *et al.*, 2006; BARONE *et al.*, 2006; HAUSER & ZESIEWICZ, 1997; MARINO *et al.*, 2008). No entanto, em um estudo com controle placebo e com uma amostra menor de pacientes não foram observados tais efeitos (LEENTJENS *et al.*, 2003c). Outros estudos clínicos foram realizados com ISRSs, porém todos sem a utilização de controle placebo. Esse quadro prejudica a avaliação dos resultados uma vez que não existe o grupo placebo para a comparação.

Ainda não existe uma literatura vasta com relação à avaliação dos efeitos dos agonistas dopaminérgicos sobre os sintomas anedônicos, depressivos e de isolamento social nos pacientes parkinsonianos. Um estudo com 9 semanas de duração mostrou que o tratamento com pramipexol (dosagem média diária de 1 mg) diminuiu a frequência da depressão e da anedonia nesses pacientes portadores da DP (LEMKE *et al.*, 2006). Um ensaio clínico aberto com duração de 6 meses observou que o pramipexol reduziu os sintomas depressivos em 56% dos pacientes. Além disso, reduziu os prejuízos motores como tremor em repouso (54%) e instabilidade postural (50%). No entanto, o pramipexol não melhorou os prejuízos cognitivos dos pacientes (LEVIN *et al.*, 2010). Em um estudo prospectivo randomizado, com controle placebo e duplo cego, o biperidil (agonista D2R/D3R) apresentou efeitos anti-

apatia, antidepressivo e ansiolítico em pacientes portadores da DP, além de uma melhora significativa na qualidade de vida desses pacientes (THOBOIS *et al.*, 2013).

4.6 Conclusões

Os tratamentos estabelecidos no trabalho atual nos permitem sugerir que alguns mecanismos possam estar relacionados com os prejuízos comportamentais observados no modelo experimental da 6-OHDA. Os efeitos dos tratamentos realizados com bupropiona e quinpirole nos permitem inferir que o neurotransmissor dopamina esteja envolvido com as respostas comportamentais observadas, e que, possivelmente, os receptores da família D2 sejam os alvos envolvidos nos efeitos dessas drogas. No entanto, o tratamento com fluoxetina também foi eficaz em prevenir parcialmente esses prejuízos. Assim, é importante ressaltar o possível envolvimento do neurotransmissor serotonina nos prejuízos comportamentais induzidos pela 6-OHDA.

5 Capítulo 5

Considerações finais

Através da utilização de abordagens comportamentais, neuroquímicas e eletrofisiológicas, este estudo investigou a dissociação temporal e estrutural entre os papéis do EDL e do CPF nos comportamentos relacionados à anedonia e à depressão em ratos submetidos a lesões bilaterais com 6-OHDA no EDL. Nossos resultados fornecem a primeira evidência de um envolvimento diferencial entre o estriado e o CPF, no comportamento anedônico e do tipo depressivo, respectivamente, em um modelo experimental da DP. Estas modificações comportamentais foram acompanhadas por flutuações temporais na densidade de receptores dopaminérgicos, que induzem um prejuízo pré-sináptico e também alteração da sensibilidade à dopamina no estriado e CPF.

Algumas teorias preconizam que mecanismos relacionados ao estresse poderiam induzir comportamentos anedônicos, cujos mecanismos neurobiológicos subjacentes estariam envolvidos com alterações na via dopaminérgica mesolímbica, que se sabe está implicada em comportamentos motivacionais. Alguns questionamentos a respeito da etiologia da depressão ainda continuam sem respostas. Essas lacunas necessitam ser preenchidas por novos estudos na tentativa de aumentar o conhecimento a respeito desse transtorno do humor na DP. Para isso é necessário dar mais atenção a algumas questões que até aqui tem sido negligenciada como: o tratamento farmacológico ineficaz e o desconhecimento sobre as bases neurobiológicas subjacentes. Por outro lado, o desenvolvimento de novas terapias depende da existência de modelos animais representativos que facilitem a avaliação de efeitos preditivos de novos agentes farmacológicos, afim de que possam ser testados em ensaios clínicos (OBESO *et al.*, 2008).

Alguns estudos de neuroimagem investigaram pacientes sintomáticos com o transtorno de depressão. Esses pacientes apresentaram uma redução nos níveis do DAT, essa característica também é observada em pacientes portadores da DP, e foi também observado no presente estudo com ratos tratados com 6-OHDA. Esse achado pode ser uma resposta relacionada com a redução da transmissão dopaminérgica. No entanto, não se pode excluir que essa redução seja uma anormalidade que predisponha ao transtorno de depressão. Nossos resultados indicam a possibilidade de que a diminuição na marcação para o DAT no CPF esteja relacionada aos sintomas depressivos e seja uma consequência da diminuição da sensibilidade à dopamina. Esse ponto de vista é reforçado pelas alterações na sensibilidade a dopamina

detectadas no EDL. No entanto, a diminuição nos níveis do DAT só foi observada aos 21 dias e pode estar relacionada ao processo degenerativo em questão, observado com a marcação de TH e de FJB.

A depressão tem sido associada com alterações na via mesocorticolímbica dopaminérgica. Além desta, outras regiões envolvidas com controle emocional estão afetadas na DP, como o CPF, a amígdala e o hipocampo (PIZZAGALLI & TREADWAY, 2014). Os nossos resultados inovam, pois mostram uma diminuição da sensibilidade à dopamina no CPFm pré-límbico associada à exibição de comportamentos de desamparo e de isolamento social. Esta região exerce o controle dopaminérgico das funções do CPF, que são importantes para a manutenção de suas atividades, sejam essas emocionais ou cognitivas (DIORIO *et al.*, 1993).

Os nossos resultados sugerem que a injeção de 6-OHDA no EDL induziu alterações no CPF após 21 dias, e que isso diminuiu o controle inibitório exercido pela dopamina, conduzindo à exibição dos prejuízos comportamentais. Estudos já abordaram o papel do CPF no controle de respostas ao estresse, e sugerem que o CPF poderia inibir algumas de suas aferências para mediar o aumento da resiliência associada a eventos estressantes incontroláveis (MAIER *et al.*, 2006). No entanto, essa função poderia estar prejudicada no nosso modelo experimental, devido à diminuição na sensibilidade à dopamina das populações neuronais do CPFm.

O CPF é innervado por axônios de neurônios dopaminérgicos provenientes da ATV e da SNc (BJÖRKLUND & DUNNETT, 2007). Essas vias podem modificar as funções corticais via D1R e D2R (SEAMANS & YANG, 2004). A diminuição seletiva da dopamina no CPF de macacos induz prejuízos nas funções executivas (BROZOSKI *et al.*, 1979). Além desta, outras funções podem ser afetadas com alterações dopaminérgicas no CPF. Dentre essas, podem ser citados alguns transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia, depressão e o déficit de atenção e hiperatividade (PUIG *et al.*, 2014). Alterações funcionais do córtex e do estriado já foram observadas nos casos de depressão maior. Em um estudo pré-clínico, observou-se que o tratamento crônico de camundongos com fluoxetina alterou padrões nos neurônios corticoestriatais IT, mas não nos TP na camada 5 (SHEPHERD, 2013).

Com relação aos tratamentos farmacológicos realizados, um estudo observou o efeito do tratamento com a fluoxetina sobre a

atividade cerebral de ratos, através de técnica de neuroimagem. A fluoxetina aumentou a atividade no hipocampo dorsal e reduziu no córtex pré-límbico, sugerindo que esses efeitos são via neurotransmissão serotoninérgica (JANG *et al.*, 2009). No entanto, sabe-se que a dopamina também é um importante mecanismo para inibir o CPFm pré-límbico (PUIG *et al.*, 2014). Nossos resultados da avaliação da sensibilidade à dopamina no CPFm mostram que a 6-OHDA diminuiu a inibição causada por este neurotransmissor. Dessa maneira, sugere-se que os comportamentos tipo desamparo e de isolamento social estejam relacionados com essa diminuição dos efeitos da dopamina no CPFm pré-límbico. Ademais, os tratamentos crônicos com a fluoxetina, a bupropiona ou o quinpirole foram capazes de prevenir tais prejuízos comportamentais, seja por mecanismos serotoninérgicos e/ou dopaminérgicos.

Em conjunto, podemos ressaltar que o modelo experimental da DP com injeção de 6-OHDA no EDL gerou degeneração de neurônios da via nigroestriatal. Isso induziu prejuízos comportamentais motores e não motores. Os sintomas não motores apresentaram-se dissociados com relação ao tempo de avaliação e a estrutura cerebral avaliada. Observou-se também que os tratamentos com antidepressivos ou com um agonista dopaminérgico foram eficazes em reverter tais prejuízos. Isso valida nossas respostas comportamentais e sugere os mecanismos possivelmente envolvidos com tais respostas, como pode ser observado na **Fig.39**.

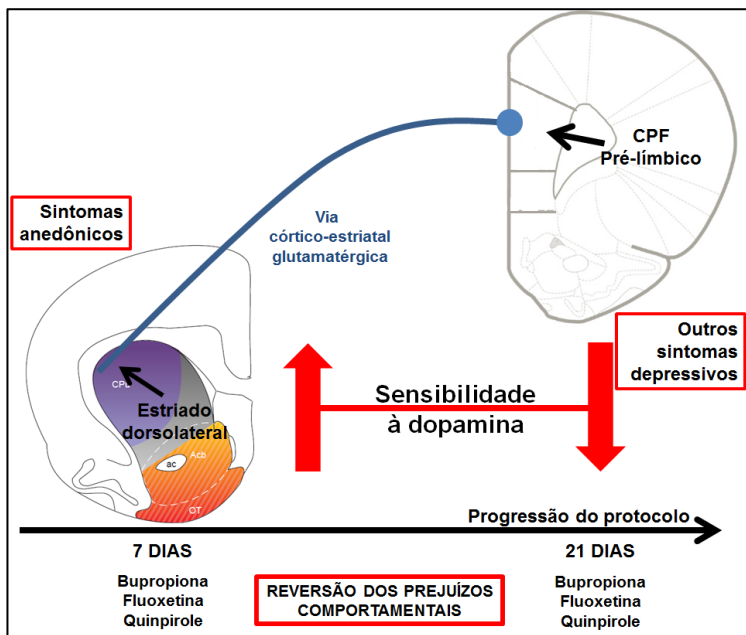


Figura 39: Resumo dos resultados obtidos no presente estudo com o modelo experimental da 6-OHDA. De acordo com a progressão do protocolo, a exibição de sintomas relacionados à anedonia encontram-se dissociados dos outros sintomas da depressão. No início do protocolo os sintomas anedônicos estão associados ao aumento da sensibilidade à dopamina no estriado dorso lateral (EDL) (em roxo). Nos estágios finais do protocolo os sintomas depressivos ocorreram juntamente com a diminuição da sensibilidade à dopamina no córtex pré-frontal medial (CPFm) pré-límbico. Via córtico-estriatal (linha em azul).

Nos últimos anos houve um interesse crescente na pesquisa da depressão associada à DP. Isso ocorre pois é um tema muito relevante para a qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos, que afeta em torno de 40 % dos pacientes. Nesse sentido, os nossos resultados evidenciam, de forma pioneira, uma dissociação temporal e estrutural das funções do estriado e do córtex pré-frontal relacionadas com alterações comportamentais não motoras. Estes dados suscitam novidades a respeito da base neurobiológica subjacente à dissociação entre a anedonia e a depressão na DP. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos exatos subjacentes a estas condições ainda precisam ser esclarecidos.

6 Referências bibliográficas

- AFIFI AK. 1994. Basal ganglia: functional anatomy and physiology. Part 2. *J Child Neurol* 9(4):352-361.
- AGRAWAL AK, HUSAIN R, RAGHUBIR R, KUMAR A, SETH PK. 1995. Neurobehavioral, neurochemical and electrophysiological studies in 6-hydroxydopamine lesioned and neural transplanted rats. *Int J Dev Neurosci* 13(2):105-111.
- ALBIN RL, YOUNG AB, PENNEY JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends neurosci* 12(10):366-375.
- ALTHAUS A, BECKER OA, SPOTTKE A, DENGLER R, SCHNEIDER F, KLOSS M, EGGERT K, OERTEL WH, DILLMANN U, HERTING B, CLASSEN J, DODEL R. 2008. Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. *Parkinsonism Relat Disord* 14(8):626-632.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)*. 2013. 5. ed. Arlington, VA.
- ANDRINGA G, VAN OOSTEN RV, UNGER W, HAFMANS TG, VEENING J, STOOF JC, COOLS AR. 2000. Systemic administration of the propargylamine CGP 3466B prevents behavioural and morphological deficits in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions in the substantia nigra. *Eur J Neurosci* 12(8):3033-3043.
- ANTONINI A, TESEI S, ZECCHINELLI A, BARONE P, DE GASPARI D, CANESI M, SACILOTTO G, MEUCCI N, MARIANI C, PEZZOLI G. 2006. Randomized study of sertraline and low-dose amitriptyline in patients with Parkinson's disease and depression: effect on quality of life. *Mov Disord* 21(8):1119-1122.
- BARONE P, SCARZELLA L, MARCONI R, ANTONINI A, MORGANTE L, BRACCO F, ZAPPIA M, MUSCH B; DEPRESSION/PARKINSON ITALIAN STUDY GROUP. 2006. Pramipexole versus sertraline in the treatment of depression in Parkinson's disease: a national multicenter parallel-group randomized study. *J Neurol* 253(5):601-607.

- BARONE P, POEWE W, ALBRECHT S, DEBIEUVRE C, MASSEY D, RASCOL O, TOLOSA E, WEINTRAUB D. 2010. Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 9(6):573-580.
- BARRIO J, HUANG S, PHELPS M. 1997. Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases. *Biochem Pharmacol.* 54(3):341-348.
- BASSO AM, GALLAGHER KB, BRATCHER NA, BRIONI JD, MORELAND RB, HSIEH GC, DRESCHER K, FOX GB, DECKER MW, RUETER LE. 2005. Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology* 30(7):1257-1268.
- BECKER C, BROBERT GP, JOHANSSON S, JICK SS, MEIER CR. 2011. Risk of incident depression in patients with Parkinson disease in the UK. *Eur J Neurol* 18(3):448-453.
- BEHARI M, SRIVASTAVA AK, PANDEY RM. 2005. Quality of life in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11(4):221-226.
- BELL PT, GILAT M, O'CALLAGHAN C, COPLAND DA, FRANK MJ, LEWIS SJ, SHINE JM. 2014. Dopaminergic basis for impairments in functional connectivity across subdivisions of the striatum in Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp* [Epub ahead of print].
- BENAZZI F. 2006. Various forms of depression. *Dialogues Clin Neurosci* 8(2):151-161.
- BERG D, POSTUMA RB, BLOEM B, CHAN P, DUBOIS B, GASSER T, GOETZ CG, HALLIDAY GM, HARDY J, LANG AE, LITVAN I, MAREK K, OBESO J, OERTEL W, OLANOW CW, POEWE W, STERN M, DEUSCHL G. 2014. Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord* 29(4): 454-462.
- BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA K, KUTER K, KOLASIEWICZ W, GŁOWACKA U, DZIUBINA A, OSSOWSKA K, WARDAS J. 2014. Pramipexole but not imipramine or fluoxetine reverses the "depressive-

like" behaviour in a rat model of preclinical stages of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 271:343-353.

BERGMAN H, WICHMANN T, DELONG MR. 1990. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science (New York, N.Y.)* 249(6): 1436–1438.

BERTELLI JA, MIRA JC. 1995. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 58(1-2):151-155.

BEVAN MD, ATHERTON JF, BAUFRETON J. 2006. Cellular principles underlying normal and pathological activity in the subthalamic nucleus. *Curr Opin Neurobiol* 16:621–628.

BEZARD E, GROSS CE. 1998. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 55(2):93-116.

BJÖRKLUND A, DUNNETT SB. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30(5):194-202.

BLANDINI F, NAPPI G, TASSORELLI C, MARTIGNONI E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62(1):63-88.

BLANDINI F, ARMENTERO MT, MARTIGNONI E. 2008. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism Relat Disord Suppl* 2: S124-S129.

BLESA J, PRZEDBORSKI S. 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 8:155.

BLIER P. 2013. Neurotransmitter targeting in the treatment of depression. *J Clin Psychiatry* 74: 19–24.

BOHNEN N, ALBIN R. 2011. The Cholinergic System in Parkinson's Disease. *Behav Brain Res* 221(2): 564–573.

BONITO-OLIVA A, PIGNATELLI M, SPIGOLON G, YOSHITAKE T, SEILER S, LONGO F, PICCININ S, KEHR J, MERCURI NB, NISTICÒ R, FISONE G. 2013. Cognitive Impairment and Dentate Gyrus Synaptic Dysfunction in Experimental Parkinsonism. *Biol Psychiatry* 75(9):701-710.

- BONNET AM, JUTRAS MF, CZERNECKI V, CORVOL JC, VIDAILHET M. 2012. Nonmotor symptoms in Parkinsons disease in 2012: Relevant clinical aspects. *Parkinsons Dis* 2012:198316.
- BORAH A, MOHANAKUMAR KP. 2007. Long-term L-DOPA treatment causes indiscriminate increase in dopamine levels at the cost of serotonin synthesis in discrete brain regions of rats. *Cell Mol Neurobiol* 27(8):985-996.
- BORSINI F, LECCI A, MANCINELLI A, D'ARANNO V, MELI A. 1988. Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. *Eur J Pharmacol* 148(3):301-307.
- BRAAK H, DEL TREDICI K, RÜB U, DE VOS RA, JANSEN STEUR EN, BRAAK E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197–211.
- BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RÜB U, BRATZKE H, DEL TREDICI K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 2004 318(1):121-134.
- BRAUN AA, GRAHAM DL, SCHAEFER TL, VORHEES CV, WILLIAMS MT. 2012. Dorsal striatal dopamine depletion impairs both allocentric and egocentric navigation in rats. *Neurobiol Learn Mem* 97(4):402-408.
- BRICHTA L, GREENGARD P. 2014. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat* 8:152.
- BRICHTA L, GREENGARD P, FLAJOLET M. 2013. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: Targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci* 36(9):543-554.
- BROCCO M, DEKEYNE A, PAPP M, MILLAN MJ. 2006. Antidepressant-like properties of the anti-Parkinson agent, piribedil, in rodents: mediation by dopamine D2 receptors. *Behav Pharmacol* 17(7):559-572.
- BROWN RG, MACCARTHY B. 1990. Psychiatric morbidity in patients with Parkinson's disease. *Psychol Med* 20(1):77-87.

BROZOSKI TJ, BROWN RM, ROSVOLD HE, GOLDMAN PS. 1979. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205(4409):929-932.

BRUNTON LL, CHABNER BA, KNOLLMANN BC. 2012. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12 ed. McGraw Hill, 2112p.

BURKARD WP, JALFRE M, BLUM J. 1969. Effect of 6-hydroxydopamine on behaviour and cerebral amine content in rats. *Experientia* 25(12): 1295–1296.

CANTELO R, AGUGLIA M, GILLI M, DELSEDIME M, CHIARDÒ CUTIN I, RICCIO A, MUTANI R. 1989. Major depression in Parkinson's disease and the mood response to intravenous methylphenidate: possible role of the "hedonic" dopamine synapse. *J Neurol Neurosurg Psy* 52(6):724-731.

CAROD-ARTAL FJ, ZIOMKOWSKI S, MOURÃO MESQUITA H, MARTÍNEZ-MARTIN P. 2008. Anxiety and depression: main determinants of health-related quality of life in Brazilian patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14(2):102-108.

CARVALHO MM, CAMPOS FL, COIMBRA B, PÊGO JM, RODRIGUES C, LIMA R, RODRIGUES AJ, SOUSA N, SALGADO AJ. 2013. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener* 8:14.

CERAVOLO R, NUTI A, PICCINNI A, DELL'AGNELLO G, BELLINI G, GAMBACCINI G, DELL'OSSO L, MURRI L, BONUCCELLI U. 2000. Paroxetine in Parkinson's disease: effects on motor and depressive symptoms. *Neurology* 55(8):1216-1218.

CHAO OYH, PUM ME, HUSTON JP. 2013. The interaction between the dopaminergic forebrain projections and the medial prefrontal cortex is critical for memory of objects: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 247:373-82.

CHAUDHURI KR, HEALY DG, SCHAPIRA AHV. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease : diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5(3): 235-245.

CHAUDHURY D, WALSH JJ, FRIEDMAN AK, JUAREZ B, KU SM, KOO JW, FERGUSON D, TSAI HC, POMERANZ L, CHRISTOFFEL DJ, NECTOW AR, EKSTRAND M, DOMINGOS A, MAZEI-ROBISON MS, MOUZON E, LOBO MK, NEVE RL, FRIEDMAN JM, RUSSO SJ, DEISSEROTH K, NESTLER EJ, HAN MH. 2013. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493(7433):532-536.

CHEN L, LIU J, ZHANG QJ, FENG JJ, GUI ZH, ALI U, WANG Y, FAN LL, HOU C, WANG T. 2011. Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. *Brain Res Bull* 85(6):329-38.

CHENU F, DAILLY E, BOURIN M. 2007. Effect of antidepressant drugs on 6-OHDA-treated mice in the FST. *Eur Neuropsychopharmacol* 17(3):187-193.

CHOI C, SOHN YH, LEE JH, KIM J. 2000. The effect of long-term levodopa therapy on depression level in de novo patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 172(1):12-16.

CICCHETTI F, DROUIN-OUELLET J, GROSS RE. 2009. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 475-483.

CIOLI I, CARICATI A, NENCINI P. 2000. Quinpirole and amphetamine-induced hyperdipsia: influence of fluid palatability and behavioral cost. *Behav Brain Res* 109(1):9-18.

CONNOLLY BS, LANG AE. 2014. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 311(16): 1670-1683.

COOLS R, D'ESPOSITO M. 2011. Inverted-U-shaped dopamine actions on human working memory and cognitive control. *Biol Psychiatry* 69(12):e113-125.

COSTA FH, ROSSO AL, MAULTASCH H, NICARETTA DH, VINCENT MB. 2012. Depression in Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Arq Neuropsiquiatr* 70(8):617-620.

- COSTENLA AR, DIÓGENES MJ, CANAS PM, RODRIGUES RJ, NOGUEIRA C, MAROCO J, AGOSTINHO PM, RIBEIRO JA, CUNHA RA, DE MENDONÇA A. 2011. Enhanced role of adenosine A_{2A} receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. *Eur J Neurosci* 34: 12-21.
- CRAFT TKS, DEVRIES AC. 2006. Role of IL-1 in poststroke depressive-like behavior in mice. *Biol Psychiatry* 60(8):812-818.
- CRUZ AP, FREI F, GRAEFF FG. 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49(1):171-176.
- CRYAN JF, LUCKI I. 2000. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295(3):1120-1126.
- CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5):238-245.
- CRYAN JF, VALENTINO RJ, LUCKI, I. 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5):547-569.
- DANTZER R, BLUTHE RM, KOOB GF, LE MOAL M. 1987. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology* 91:363-368.
- D'AQUILA P, MONLEON S, BORSINI F, BRAIN P, WILLNER P. 1997. Anti-anhedonic actions of the novel serotonergic agent flibanserin, a potential rapidly-acting antidepressant. *Eur J Pharmacol* 340(2-3):121-132.
- DAUER W, PRZEDBORSKI S. 2003. Parkinson's Disease. *Neuron* 39: 889-909.
- DAWSON GR, TRICKLEBANK MD. 1995. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 16(2):33-36.
- DE LA FUENTE-FERNÁNDEZ R. 2013. Imaging of dopamine in PD and implications for motor and neuropsychiatric manifestations of PD. *Front Neurol* 4:90.

DE LAU LML, BRETELER MMB. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology* 5(6): 525–535.

DELL'AGNELLO G, CERA VOLO R, NUTI A, BELLINI G, PICCINNI A, D'AVINO C, DELL'OSSO L, BONUCCELLI U. 2001. SSRIs do not worsen Parkinson's disease: evidence from an open-label, prospective study. *Clin Neuropharmacol* 24(4):221-227.

DEL TREDICI K, BRAAK H. 2013. Dysfunction of the locus coeruleus-norepinephrine system and related circuitry in Parkinson's disease-related dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84(7):774-783.

DER-AVAKIAN A, MARKOU A. 2012. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci* 35(1):68-77.

DEUMENS R, BLOKLAND A, PRICKAERTS J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175(2):303-317.

DEVAN BD, HONG NS, MCDONALD RJ. 2011. Parallel associative processing in the dorsal striatum: Segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. *Neurobiol Learn Mem* 96(2): 95-120

DEVOS D, DUJARDIN K, POIROT I, MOREAU C, COTTENCIN O, THOMAS P, DESTÉE A, BORDET R, DEFEBVRE L. 2008. Comparison of desipramine and citalopram treatments for depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Mov Disord* 23(6):850-857.

DI MONTE DA, LAVASANI M, MANNING-BOG AB. 2002. Environmental factors in Parkinson's disease. *NeuroToxicology* 23: 487–502.

DIORIO D, VIAU V, MEANEY MJ. 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13(9):3839-3847.

DORSEY ER, CONSTANTINESCU R, THOMPSON JP, BIGLAN KM, HOLLOWAY RG, KIEBURTZ K, MARSHALL FJ, RAVINA BM, SCHIFITTO G, SIDEROWF A, TANNER CM. 2007. Projected

number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68:384–386.

DREVETS WC, PRICE JL, SIMPSON JR JR, TODD RD, REICH T, VANNIER M, RAICHLE ME. 1997. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386(6627):824-827.

DREVETS WC, PRICE JL, FUREY ML. 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213(1-2):93-118.

DREW MR, SIMPSON EH, KELLENDONK C, HERZBERG WG, LIPATOVA O, FAIRHURST S, KANDEL ER, MALAPANI C, BALSAM PD. 2007. Transient overexpression of striatal D2 receptors impairs operant motivation and interval timing. *J Neurosci* 27(29):7731-7739.

DREYER JK. 2014. Three mechanisms by which striatal denervation causes breakdown of dopamine signaling. *J Neurosci* 34(37):12444-12456.

DUJARDIN K, LANGLOIS C, PLOMHAUSE L, CARETTE AS, DELLIAUX M, DUHAMEL A, DEFEBVRE L. 2014. Apathy in untreated early-stage Parkinson disease: Relationship with other non-motor symptoms. *Mov Disord* 29(14):1796-1801.

DUMAN RS, AGHAJANIAN GK. 2012. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338(6103):68-72.

DURSO R, EVANS JE, JOSEPHS E, SZABO G, EVANS B, FERNANDEZ HH, BROWNE TR. 2000. Variable absorption of carbidopa affects both peripheral and central levodopa metabolism. *J Clin Pharmacol* 40(8): 854-860.

EHRT U, BRØNNICK K, LEENTJENS AF, LARSEN JP, AARSLAND D. 2006. Depressive symptom profile in Parkinson's disease: a comparison with depression in elderly patients without Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 21(3):252-258.

- ERRO R, SANTANGELO G, BARONE P, VILATE C. 2015. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: classification and management. *J Parkinson Rest Legs Synd* 5:1–10.
- ESKOW JAUNARAJ S KL, ANGOA-PEREZ M, KUHN DM, BISHOP C. 2011. Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of L-DOPA treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 35(3):556-564.
- ESTATÍSTICA, I. B. DE G. E. Censo 2010. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- FARABAUGH AH, LOCASCIO JJ, YAP L, WEINTRAUB D, MCDONALD WM, AGOSTON M, ALPERT JE, GROWDON J, FAVA M. 2009. Pattern of depressive symptoms in Parkinson's disease. *Psychosomatics* 50(5):448-454.
- FENG Y, JANKOVIC J, WU YC. 2015. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 349:3–9.
- FERRO MM, BELLISSIMO MI, ANSELMO-FRANCI JA, ANGELLUCCI ME, CANTERAS NS, DA CUNHA C. 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods* 148(1):78-87, 2005.
- FOYET HS, HRITCU L, CIOBICA A, STEFAN M, KAMTCHOUING P, COJOCARU D. 2011. Methanolic extract of Hibiscus asper leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol* 133(2):773-779.
- FRIEDMAN AK, WALSH JJ, JUAREZ B, KU SM, CHAUDHURY D, WANG J, LI X, DIETZ DM, PAN N, VIALOU VF, NEVE RL, YUE Z, HAN MH. 2014. Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science* 344(6181):313-319.
- FRISINA PG, HAROUTUNIAN V, LIBOW LS. 2009. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15(2):144-148.

- FUJIWARA S, KIMURA F, HOSOKAWA T, ISHIDA S, SUGINO M, HANAFUSA T. 2011. Anhedonia in Japanese patients with Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int* 11(3):275-281.
- GAO F, GAO Y, LIU YF, WANG L, LI YJ. 2014. Berberine exerts an anticonvulsant effect and ameliorates memory impairment and oxidative stress in a pilocarpine-induced epilepsy model in the rat. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10:2139-2145.
- GARCIA-RUIZ PJ, CHAUDHURI KR, MARTINEZ-MARTIN P. 2014. Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review from the past. *J Neurol Sci* 338(1-2):30-33.
- GILBERT SJ, BURGESS PW. 2008. Executive function. *Current biology* 18(3):R110-114.
- GIROUX ML. 2007. Parkinson disease: Managing a complex, progressive disease at all stages. *Cleve Clin J Med* 74(5): 313-328.
- GOLDMAN SM. 2014. Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54:141-164.
- GOETZ CG. 2010. New developments in depression, anxiety, compulsiveness, and hallucinations in Parkinson's disease. *Mov Disord* 25(1):S104-109.
- GRACE AA, FLORESCO SB, GOTO Y, LODGE DJ. 2007. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30(5):220-227.
- GREENE J, BANASR M, LEE B, WARNER-SCHMIDT J, DUMAN RS. 2009. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacol* 34(11):2459-2468.
- GUI ZH, ZHANG QJ, LIU J, ZHANG L, ALI U, HOU C, FAN LL, SUN YN, WU ZH, HUI YP. 2011. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the response of fast-spiking interneurons in the medial prefrontal cortex to 5-HT1A receptor agonist and expression of the receptor in parvalbumin-positive neurons in the rat. *Neurochem Int* 59(5):618-627.

- GULLEDGE AT, JAFFE DB. 2001. Multiple effects of dopamine on layer V pyramidal cell excitability in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 86(2):586-595.
- GUPTA D, RADHAKRISHNAN M, THANGARAJ D, KURHE Y. 2014. Antidepressant and anti-anxiety like effects of 4i (N-(3-chloro-2-methylphenyl) quinoxalin-2-carboxamide), a novel 5-HT₃ receptor antagonist in acute and chronic neurobehavioral rodent models. *Eur J Pharmacol* 735:59-67.
- GUTHRIE M, LEBLOIS A, GARENNE A, BORAUD T. 2013. Interaction between cognitive and motor cortico-basal ganglia loops during decision making : a computational study. *J Neurophysiol* 109(12):3025-3040.
- GUTTMAN M, BOILEAU I, WARSH J, SAINT-CYR JA, GINOVART N, MCCLUSKEY T, HOULE S, WILSON A, MUNDO E, RUSJAN P, MEYER J, KISH SJ. 2007. Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 14(5):523-528.
- GROSS M, NAKAMURA L, PASCUAL-LEONE A, FREGNI F. 2007. Has repetitive transcranial magnetic stimulation (RTMS) treatment for depression improved? A systematic review and meta-analysis comparing the recent vs the earlier RTMS studies. *Acta Psychiatr Scand* 116:165–173.
- HAPPEL MF, DELIANO M, HANDSCHUH J, OHL FW. 2014. Dopamine-modulated recurrent corticoefferent feedback in primary sensory cortex promotes detection of behaviorally relevant stimuli. *J Neurosci* 34(4):1234-1247.
- HAUSER RA, ZESIEWICZ TA. 1997. Sertraline for the treatment of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord* 12(5):756-759.
- HEUER A, SMITH GA, LELOS MJ, LANE EL, DUNNETT SB. 2012. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav Brain Res* 228(1): 30-43.
- HOBSON P, HOLDEN A, MEARA J. 1999. Measuring the impact of Parkinson's disease with the Parkinson's Disease Quality of Life questionnaire. *Age and ageing* 28(4):341–346.

- HOLLOWAY RG, SHOULSON I, FAHN S, KIEBURTZ K, LANG A, MAREK K. 2004. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. *Arch Neurol* 61(7):1044-1053.
- HUSSAIN RJ, JACOBSON L. 2015. Increased antidepressant sensitivity after prefrontal cortex glucocorticoid receptor gene deletion in mice. *Physiol Behav* 138:113-117.
- IBGE. *Censo Demográfico 2000 - Resultados do universo*. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default_censo_2000.shtm. Acesso em: 10 jan 2015.
- ISELLA V, IURLARO S, PIOLTI R, FERRARESE C, FRATTOLA L, APPOLLONIO I, MELZI P, GRIMALDI M. 2003. Physical anhedonia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(9):1308-1311.
- ISINGRINI E, CAMUS V, LE GUIQUET AM, PINGAUD M, DEVERS S, BELZUNG C. 2010. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One* 5(4):e10404.
- JANG DP, LEE SH, PARK CW, LEE SY, KIM YB, CHO ZH. 2009. Effects of fluoxetine on the rat brain in the forced swimming test: A [¹⁸F]-FDG micro-PET imaging study. *Neurosci Lett* 451(1):60-64.
- JAUNARAJ KLE, GEORGE JA, BISHOP C. 2012. L-DOPA-induced dysregulation of 49 extrastriatal dopamine and serotonin and affective symptoms in a bilateral rat model of 50 Parkinson's disease. *Neuroscience*. 218:243-256.
- JOHNSTONE T, VAN REEKUM CM, URRY HL, KALIN NH, DAVIDSON RJ. 2007. Failure to regulate: counterproductive recruitment of top-down prefrontal-subcortical circuitry
- JORDAN LL, ZAHODNE LB, OKUN MS, BOWERS D. 2013. Hedonic and behavioral deficits associated with apathy in Parkinson's disease: potential treatment implications. *Mov Disord* 28(9):1301-1304.

KANDEL E, SCHWARTZ J, JESSELL, TM, SIEGELBAUM S, HUDSPETH AJ. 2014. *Princípios de Neurociências*. 5. ed. São Paulo: Artmed.

KARLSEN KH, LARSEN JP, TANDBERG E, MAELAND JG. 1999. Influence of clinical and demographic variables on quality of life in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66(4):431-435.

KEHAGIA AA, BARKER RA, ROBBINS TW. 2010. Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 9(12):1200-1213.

KENNEDY JL, FARRER LA, ANDREASEN NC, MAYEUX R, ST GEORGE-HYSLOP P. 2003. The genetics of adult-onset neuropsychiatric disease: complexities and conundra? *Science (New York, N.Y.)* 302(2001): 822–826.

KHEIRBEK MA, HEN R. 2011. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implications for cognition and mood. *Neuropsychopharmacology* 36(1):373-374.

KOROS E, ROSENBROCK H, BIRK G, WEISS C, SAMS-DODD F. 2007. The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. *Neuropsychopharmacology* 32(3):562-576.

KRISHNAN V, NESTLER EJ. 2010. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 167(11):1305-1320.

KUMAR A, SHARMA N, GUPTA A, KALONIA H, MISHRA J. 2012. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. *Brain Res* 1471:13-22.

KUPSCH A, SCHMIDT W, GIZATULLINA Z, DEBSKA-VIELHABER G, VOGES J, STRIGGOW F, PANTHER P, SCHWEGLER H, HEINZE HJ, VIELHABER S, GELLERICH FN. 2014. 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: respirometric, histological, and behavioral analyses. *J Neural Transm* 121(10):1245-1257.

- LANDRIGAN PJ, SONAWANE B, BUTLER RN, TRASANDE L, CALLAN R, DROLLER D. 2005. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environmental Health Perspectives* 113(9): 1230–1233.
- LANGSTON JW, BALLARD P, TETRUD JW, IRWIN I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)* 219(4587):979–980.
- LANGSTON JW, IRWIN I, LANGSTON EB, FORNO LS. 1984. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neuroscience letters* 48: 87–92.
- LEE JY, JEON BS. 2014. Maladaptive reward-learning and impulse control disorders in patients with Parkinson's disease: a clinical overview and pathophysiology update. *J Mov Disord* 7(2):67-76.
- LEENTJENS AFG, MARINUS J, VAN HILTEN JJ, LOUSBERG R, VERHEY FR. 2003a. The contribution of somatic symptoms to the diagnosis of depressive disorder in Parkinson's disease: a discriminant analytic approach. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15(1):74-77.
- LEENTJENS AFG, VAN DEN AKKER M, METSEMAKERS JF, LOUSBERG R, VERHEY FR. 2003b. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Mov Disord* 18(4):414-418.
- LEENTJENS AF, VREELING FW, LUIJCKX GJ, VERHEY FR. 2003c. SSRIs in the treatment of depression in Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 18: 552-554.
- LEMKE MR, BRECHT HM, KOESTER J, KRAUS PH, REICHMANN H. 2005. Anhedonia, depression, and motor functioning in Parkinson's disease during treatment with pramipexole. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17(2):214-220.
- LEMKE MR, BRECHT HM, KOESTER J, REICHMANN H. 2006. Effects of the dopamine agonist pramipexole on depression, anhedonia and motor functioning in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 248(1-2):266-270.

LEMKE MR. 2008. Depressive symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 15(Suppl 1):21–25.

LEVIN OS, BOŬKO AN, NESTEROVA OS, OTCHESKAIA OV, ZHURAVLEVA EIU, ARTEMOVA IIU, KHOZOVA AA, ISMAILOV AM, LISENER LN, VDOVICHENKO TV, ROTOR LD, GANZHULA PA, IVANOV AK. 2010. Effect of dopamine agonist pramipexole (mirapex) on tremor, affective disorders and quality of life in patients with Parkinson's disease. *Nevrol Psi S S Kors* 110(2):39-44.

LI XM, CHLAN-FOURNEY J, JUORIO AV, BENNETT VL, SHRIKHANDE S, BOWEN RC. 2000. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J Psychiatry Neurosci* 25(1):43-47.

LIEBERMAN A. 2006. Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurol Scand* 113(1):1–8.

LITTELJOHN D, MANGANO E, SHUKLA N, HAYLEY S. 2009. Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. *Neuroscience* 164(4):1894–1906.

LOAS G, DURU C, GODEFROY O, KRYSKOWIAK P. 2014. Hedonic deficits in Parkinson's disease: is consummatory anhedonia specific? *Front Neurol* 5:24.

LOAS G, KRYSKOWIAK P, GODEFROY O. 2012. Anhedonia in Parkinson's Disease : An Overview. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24(4):444-451.

LÓPEZ-RUBALCAVA C, LUCKI I. 2000. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 22(2):191-199.

LUO C, CHEN Q, SONG W, CHEN K, GUO X, YANG J, HUANG X, GONG Q, SHANG HF. 2014. Resting-state fMRI study on drug-naive patients with Parkinson's disease and with depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85(6): 675-683.

- MAETZLER W, LIEPELT I, BERG, D. 2009. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol* 8(12):1158-1171.
- MAIER SF, AMAT J, BARATTA MV, PAUL E, WATKINS LR. 2006. Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8(4):397-406.
- MAJ J, ROGÓZ Z, SKUZA G, KOŁODZIEJCZYK K. 1997. The behavioural effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 324(1):31-37.
- MALBERG JE, EISCH AJ, NESTLER EJ, DUMAN RS. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20(24):9104-9110.
- MANEETON N, MANEETON B, SRISURAPANONT M, MARTIN SD. 2011. Bupropion for adults with attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Psychiatry Clin Neurosci* 65(7):611-617.
- MARCHAND WR. 2012. Self-referential thinking, suicide, and function of the cortical midline structures and striatum in mood disorders: possible implications for treatment studies of mindfulness-based interventions for bipolar depression. *Depress Res Treat* 2012:246725.
- MARINO S, SESSA E, DI LORENZO G, DIGANGI G, ALAGNA A, BRAMANTI P, DI BELLA P. 2008. Sertraline in the treatment of depressive disorders in patients with Parkinson's disease. *Neurol Sci* 29(6):391-395.
- MARQUIS JP, KILLCROSS S, HADDON JE. 2007. Inactivation of the prelimbic, but not infralimbic, prefrontal cortex impairs the contextual control of response conflict in rats. *Eur J Neurosci* 25(2):559-566.
- MARSIT CJ. 2015. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *Journal of Experimental Biology* 218:71–79.
- MARTINEZ-MARTIN P. 2011. The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 310(1-2): 12-16.

- MATHEUS FC, AGUIAR AS JR, CASTRO AA, VILLARINHO JG, FERREIRA J, FIGUEIREDO CP, WALZ R, SANTOS AR, TASCA CI, PREDIGER RD. 2012. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Behav Brain Res* 235(2):263-272.
- MATHEWS IZ, MCCORMICK CM. 2012. Role of medial prefrontal cortex dopamine in age differences in response to amphetamine in rats: Locomotor activity after intra-mPFC injections of dopaminergic ligands. *Dev Neurobiol* 72(11):1415-1421.
- MATSUI K, TACHIBANA H, YAMANISHI T, OGURU M, TODA K, OKUDA B, OKA N. 2013. Clinical correlates of anhedonia in patients with Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 115(12):2524-2527.
- MAYBERG HS, BRANNAN SK, TEKELL JL, SILVA JA, MAHURIN RK, MCGINNIS S, JERABEK PA. 2000. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry* 48(8):830-843.
- MAYBERG HS, LOZANO AM, VOON V, MCNEELY HE, SEMINOWICZ D, HAMANI C, SCHWALB JM, KENNEDY SH. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron* 45(5):651-660.
- MAYEUX R, STERN Y, WILLIAMS JB, COTE L, FRANTZ A, DYRENFURTH I. 1986. Clinical and biochemical features of depression in Parkinson's disease. *Am J Psychiatry* 143(6):756-759.
- MAYEUX R. 1990. Depression in the patient with Parkinson's disease. *J Clin Psychiatry* 51:20-23.
- MCDONALD WM, RICHARD IH, DELONG MR. 2003. Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry* 54(3): 363-375.
- MCKIN DL, OLINO TM, PORTA G, DIETZ LJ, EMSLIE G, CLARKE G, WAGNER KD, ASARNOW JR, RYAN ND, BIRMAHER B, SHAMSEDDIN W, MAYES T, KENNARD B, SPIRITO A, KELLER M, LYNCH FL, DICKERSON JF, BRENT DA. 2012. Anhedonia predicts poorer recovery among youth with

- selective serotonin reuptake inhibitor treatment-resistant depression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 51(4):404-411.
- MEISSNER WG. 2012. When does Parkinson's disease begin? From prodromal disease to motor signs. *Revue Neurologique* 168(11): 809–814.
- MEMBER RPE, PRASHANTH R, ROY SD, MANDAL PK, GHOSH S. 2014. Parkinson's disease detection using olfactory loss and REM sleep disorder features. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 5764-5767.
- MENESES MS, TEIVE HAG. 1996. Histórico. In: *Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4–14.
- MENZA M, MARIN H, KAUFMAN K, MARK M, LAURITANO M. 2004. Citalopram treatment of depression in Parkinson's disease: the impact on anxiety, disability, and cognition. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16(3):315-319.
- MENZA M, DOBKIN RD, MARIN H, MARK MH, GARA M, BUYSKE S, BIENFAIT K, DICKE A. 2009. A controlled trial of antidepressants in patients with Parkinson disease and depression. *Neurology* 72:886-892.
- METMAN LV, DEL DOTTO P, LEPOOLE K, KONITSIOTIS S, FANG J, CHASE TN. 1999. Amantadine for Levodopa-Induced Dyskinesias. *Arch Neurol* 56(11):1383-1386.
- MIGUELEZ C, BERROCOSO E, MICO JA, UGEDO L. 2013. L-DOPA modifies the antidepressant-like effects of reboxetine and fluoxetine in rats. *Neuropharmacol* 67:349-358.
- MOOS RH, CRONKITE RC. 1999. Symptom-based predictors of a 10-year chronic course of treated depression. *J Nerv Ment Dis* 187(6):360-368.
- MOREIRA ELG, RIAL D, AGUIAR AS JR, FIGUEIREDO CP, SIQUEIRA JM, DALBÓ S, HORST H, DE OLIVEIRA J, MANCINI G, DOS SANTOS TS, VILLARINHO JG, PINHEIRO FV, MARINO-NETO J, FERREIRA J, DE BEM AF, LATINI A, PIZZOLATTI MG, RIBEIRO-DO-VALLE RM, PREDIGER RD. 2010. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill

confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 117(12):1337-1351.

MOURA PJ, XAVIER GF. 2010. Memória de reconhecimento social em ratos. *Psicologia UsP* 21(2): 355-389.

MUÑOZ AM, REY P, SOTO-OTERO R, GUERRA MJ, LABANDEIRA-GARCIA JL. 2004. Systemic Administration of N-Acetylcysteine Protects Dopaminergic Neurons Against 6-Hydroxydopamine-Induced Degeneration. *J Neurosci Res* 76(4):551-562.

MIYASAKI JM, SHANNON K, VOON V, RAVINA B, KLEINER-FISMAN G, ANDERSON K, SHULMAN LM, GRONSETH G, WEINER WJ; QUALITY STANDARDS SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY. 2006. Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 66(7):996-1002.

NAEGELI KJ, O'CONNOR JA, BANERJEE P, MORILAK DA. 2013. Effects of milnacipran on cognitive flexibility following chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol* 703(1-3):62-66.

NAZEM S, SIDEROWF AD, DUDA JE, BROWN GK, TEN HAVE T, STERN MB, WEINTRAUB D. 2008. Suicidal and death ideation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23(11):1573-1579.

NÈGRE-PAGÈS L, GRANDJEAN H, LAPEYRE-MESTRE M, MONTASTRUC JL, FOURRIER A, LÉPINE JP, RASCOL O; DOPAMIP STUDY GROUP. 2010. Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectionnal DoPaMiP study. *Mov Disord* 25(2):157-166.

NILSSON FM, KESSING LV, BOLWIG TG. 2001. Increased risk of developing Parkinson's disease for patients with major affective disorder: a register study. *Acta Psychiatr Scand* 104(5):380-386.

O'SHEA M, MCGREGOR IS, MALLET PE. 2006. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages

produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 20(5):611-621.

OBESO JA, RODRÍGUEZ-OROZ MC, BENITEZ-TEMINO B, BLESÁ FJ, GURIDI J, MARIN C, RODRIGUEZ M. 2008. Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23: 548–559.

OSSOWSKA K, LORENC-KOCI E. 2013. Depression in Parkinson's disease. *Pharmacol Rep* 65(6):1545–1557.

OVERSTREET DH. 2012. Modeling depression in animal models. *Methods Mol Biol* 829:125-144.

OWEN AM. 2004. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist* 10(6): 525-537.

PAHWA R, TANNER CM, HAUSER RA, SETHI K, ISAACSON S, TRUONG D, STRUCK L, RUBY AE, MCCLURE NL, WENT GT, STEMPIEN MJ. 2015. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). *Mov Disord* [Epub ahead of print].

PÅLHAGEN SE, EKBERG S, WÅLINDER J, GRANÉRUS AK, GRANERUS G. 2009. HMPAO SPECT in Parkinson's disease (PD) with major depression (MD) before and after antidepressant treatment. *J Neurol* 256(9):1510-1518.

PANKOVA NB, VETRILÉ LA, BASHAROVA LA, KRUPINA NA, KHLEBNIKOVA NN, RODINA VI, KRYZHANOVSKII GN. 2004. Immunization of rats with conjugates of dopamine and serotonin with bovine serum albumin prevents the development of experimental MPTP-induced depressive syndrome (electrophysiological parameters). *Neurosci Behav Physiol* 34(2):131-138.

PARKINSON J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14(2): 223-236.

PAXINOS G, WATSON C. 2009. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6. ed. San Diego, CA: Academic Press.

PETTORRUSO M, MARTINOTTI G, FASANO A, LORIA G, DI NICOLA M, DE RISIO L, RICCIARDI L, CONTE G, JANIRI L, BENTIVOGLIO AR. 2014. Anhedonia in Parkinson's disease

patients with and without pathological gambling: a case-control study. *Psychiatry Res* 215(2):448-452.

PIZZAGALLI, D. A. 2014. Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. *Annu Rev Clin Psychol* 10:393-423.

PLUCK GC, BROWN RG. 2002. Apathy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73(6):636-642.

PONT-SUNYER C, HOTTER A, GAIG C, SEPPI K, COMPTA Y, KATZENSCHLAGER R, MAS N, HOFENEDER D, BRÜCKE T, BAYÉS A, WENZEL K, INFANTE J, ZACH H, PIRKER W, POSADA IJ, ÁLVAREZ R, ISPIERTO L, DE FÀBREGUES O, CALLÉN A, PALASÍ A, AGUILAR M, MARTÍ MJ, VALLDEORIOLA F, SALAMERO M, POEWE W, TOLOSA E. 2014. The Onset of Nonmotor Symptoms in Parkinson's disease (The ONSET PD Study). *Mov Disord* 30(2):229-237.

PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266(5604):730-732.

PORTER C, TOTARO JA, STONE C. 1963. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 140: 308-316.

POSTUMA RB, MONTPLAISIR J. 2009. Predicting Parkinson's disease - why, when, and how? *Parkinsonism and Related Disorders* 15: S105-S109.

PREDIGER RDS, FERNANDES MS, RIAL D, WOPEREIS S, PEREIRA VS, BOSSE TS, DA SILVA CB, CARRADORE RS, MACHADO MS, CECHINEL-FILHO V, COSTA-CAMPOS L. 2008. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol* 120(3):465-473.

PREDIGER RDS, AGUIAR AS JR, ROJAS-MAYORQUIN AE, FIGUEIREDO CP, MATHEUS FC, GINESTET L, CHEVARIN C, BEL ED, MONGEAU R, HAMON M, LANFUMEY L, RAISMAN-VOZARI R. 2010. Single intranasal administration of 1-methyl-4-

- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 17(2):114-129.
- PRICE JL, DREVETS WC. 2012. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. *Trends Cogn Sci* 16(1):61-71.
- PUIG MV, ANTZOULATOS EG, MILLER EK. 2014. Prefrontal dopamine in associative learning and memory. *Neuroscience* 282: 217–229.
- QUELHAS R. 2013. Psychiatric Care in Parkinson's Disease. *J Psychiatr Pract* 19(2):118-141.
- RAGOZZINO ME. 2007. The contribution of the medial prefrontal cortex, orbitofrontal cortex, and dorsomedial striatum to behavioral flexibility. *Ann N Y Acad Sci* 1121:355-375.
- RAKIC, P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10(10):724–735.
- RAMPELLO L, CHIECHIO S, RAFFAELE R, VECCHIO I, NICOLETTI F. 2002. The SSRI, citalopram, improves bradykinesia in patients with Parkinson's disease treated with L-dopa. *Clin Neuropharmacol* 25(1):21-24.
- RAMPERSAUD N, HARKAVYI A, GIORDANO G, LEVER R, WHITTON J, WHITTON PS. 2012. Exendin-4 reverses biochemical and behavioral deficits in a pre-motor 5 rodent model of Parkinson's disease with combined noradrenergic and serotonergic 6 lesions. *Neuropeptides* 46(5):183-193.
- RASCOL O, BROOKS DJ, KORCZYN AD, DE DEYN PP, CLARKE CE, LANG AE. 2000. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 20: 1484–1491.
- RASKIN S, DURST R. 2010. Bupropion as the treatment of choice in depression associated with Parkinson's disease and its various treatments. *Med Hypotheses* 75(6):544-546.
- REICHMANN H, SCHNEIDER C, LÖHLE M. 2009. Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 3:S87-92.

REKTOROVÁ I, REKTOR I, BARES M, DOSTÁL V, EHLE E, FANFRDLOVÁ Z, FIEDLER J, KLAJBLOVÁ H, KULIST'ÁK P, RESSNER P, SVÁTOVÁ J, URBÁNEK K, VELÍSKOVÁ J. 2003. Pramipexole and pergolide in the treatment of depression in Parkinson's disease: a national multicentre prospective randomized study. *Eur J Neurol* 10(4):399-406.

REMIJNSE PL, VAN DEN HEUVEL OA, NIELEN MM, VRIEND C, HENDRIKS GJ, HOOGENDIJK WJ, UYLINGS HB, VELTMAN DJ. 2013. Cognitive Inflexibility in Obsessive-Compulsive Disorder and Major Depression Is Associated with Distinct Neural Correlates. *PLoS One* 8(4):e59600.

RIEDERER P, WUKETICH S. 1976. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *Journal of neural transmission* 38(3-4): 277-301.

RIEGER JW, KIM A, ARGYELAN M, FARBER M, GLAZMAN S, LIEBESKIND M, MEYER T, BODIS-WOLLNER I. 2008. Cortical functional anatomy of voluntary saccades in Parkinson disease. *Clin EEG Neurosci* 39(4):169-174.

RIGA D, MATOS MR, GLAS A, SMIT AB, SPIJKER S, VAN DEN OEVER MC. 2014. Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci* 8:230.

ROCHA FL, MURAD MG, STUMPF BP, HARA C, FUZIKAWA C. 2013. Antidepressants for depression in Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis. *J Psychopharmacol* 27(5):417-423.

RODRIGUES M, CAMPOS LC. 2006. Estratégia para o tratamento com levodopa na Doença de Parkinson. *Revista Analytica* 23: 44-51.

RYU J, ZHANG R, HONG BH, YANG EJ, KANG KA, CHOI M, KIM KC, NOH SJ, KIM HS, LEE NH, HYUN JW, KIM HS. 2013. Phloroglucinol attenuates motor functional deficits in an animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. *PloS one* 8(8):e71178.

SACHS BD, NI JR, CARON MG. 2015. Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses

following psychosocial stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(8):2557-2562.

SAGNA A, GALLO JJ, PONTONE GM. 2014. Systematic review of factors associated with depression and anxiety disorders among older adults with Parkinson's disease. *Parkinsonism Rel Disord* 20(7):708–715.

SAHAY A, HEN R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10(9):1110-1115.

SAMII A, NUTT JG, RANSOM BR. 2004. Parkinson's disease. *Lancet* 363(9423): 1783–1793.

SANTANGELO G, MORGANTE L, SAVICA R, MARCONI R, GRASSO L, ANTONINI A, DE GASPARI D, OTTAVIANI D, TIPLE D, SIMONI L, BARONE P; PRIAMO Study Group. 2009. Anhedonia and cognitive impairment in Parkinson's disease: Italian validation of the Snaith-Hamilton Pleasure Scale and its application in the clinical routine practice during the PRIAMO study. *Parkinsonism Relat Disord* 15(8):576-581.

SANTARELLI L, SAXE M, GROSS C, SURGET A, BATTAGLIA F, DULAWA S, WEISSTAUB N, LEE J, DUMAN R, ARANCIO O, BELZUNG C, HEN R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634):805-809.

SANTIAGO RM, BARBIEIRO J, LIMA MM, DOMBROWSKI PA, ANDREATINI R, VITAL MA. 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(6):1104-1114.

SANTIAGO RM, BARBIERO J, GRADOWSKI RW, BOCHEN S, LIMA MM, DA CUNHA C, ANDREATINI R, VITAL MA. 2014. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behav Brain Res* 259:70-77.

SANTOS CM. 2012 New agents promote neuroprotection in Parkinson's disease models. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(4):410-418.

SAWADA H, IBI M, KIHARA T, URUSHITANI M, AKAIKE A, KIMURA J, SHIMOHAMA S. 1998.

Dopamine D2type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress. *Ann Neurol* 44(1):110-119.

SCHMID M, HAMMAR Å. 2013. Cognitive function in first episode major depressive disorder: poor inhibition and semantic fluency performance. *Cogn Neuropsychiatry* 18(6):515-530.

SCHMUED LC, HOPKINS KJ. 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874(2):123–130.

SCHRAG A. 2004. Psychiatric aspects of Parkinson's disease--an update. *J Neurol* 251(7):795–804.

SEAMANS JK, YANG CR. 2004. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74(1):1-58.

SEPPI K, WEINTRAUB D, COELHO M, PEREZ-LLORET S, FOX SH, KATZENSCHLAGER R, HAMETNER EM, POEWE W, RASCOL O, GOETZ CG, SAMPAIO C. 2011. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26(Suppl 3):S42-80.

SHEPHERD GM. 2013. Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nat Rev Neurosci* 14(4):278-291.

SHIBA M, BOWER JH, MARAGANORE DM, MCDONNELL SK, PETERSON BJ, AHLISKOG JE, SCHAID DJ, ROCCA WA. 2000. Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 15(4):669-677.

SILVA-ADAYA D, PÉREZ-DE LA CRUZ V, VILLEDA-HERNÁNDEZ J, CARRILLO-MORA P, GONZÁLEZ-HERRERA IG, GARCÍA E, COLÍN-BARENQUE L, PEDRAZA-CHAVERRÍ J, SANTAMARÍA A. 2011. Protective effect of L-kynurenine and

probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurenate as a protective strategy. *Neurotoxicol Teratol* 33(2):303-312.

SINGH NK, BANERJEE BD, BALA K, CHHILLAR M, CHHILLAR N. 2014. Gene-Gene and Gene-Environment Interaction on the Risk of Parkinson's Disease. *Curr Aging Sci* 7(2):101-109.

SLATTERY DA, MARKOU A, CRYAN JF. 2007. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharm* 190(4):555-568.

SLAUGHTER JR, SLAUGHTER KA, NICHOLS D, HOLMES SE, MARTENS MP. 2001. Prevalence, clinical manifestations, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 13(2):187-196.

SPALLETTA G, FAGIOLI S, MECO G, PIERANTOZZI M, STEFANI A, PISANI V, CALTAGIRONE C, PONTIERI FE, ASSOGNA F. 2013. Hedonic tone and its mood and cognitive correlates in Parkinson's disease. *Depress Anxiety* 30(1):85-91.

STAHL SM. 1998. Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiatry* 59(Suppl 4):5-14.

STARKSTEIN SE, BROCKMAN S. 2011. Apathy and Parkinson's disease. *Curr Treat Options Neurol* 13(3):267-273.

STARKSTEIN SE, BROCKMAN S, HAYHOW BD. 2012. Psychiatric syndromes in Parkinson's disease. *Curr Opin Psych*, 25:468-472.

STAYTE S, VISSEL B. 2014. Advances in nondopaminergic treatments for Parkinson's disease. *Front Neurosci* 8(113): 1-29.

SUZUKI K, OKADA K, WAKUDA T, SHINMURA C, KAMENO Y, IWATA K, TAKAHASHI T, SUDA S, MATSUZAKI H, IWATA Y, HASHIMOTO K, MORI N. 2010. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS One* 5(2):e9260.

SYED ECJ, SHAROTT A, MOLL CK, ENGEL AK, KRAL A. 2011. Effect of sensory stimulation in rat barrel cortex, dorsolateral striatum

and on corticostriatal functional connectivity. *Eur J Neurosci* 33(3):461-470.

TADAIESKY MT, DOMBROWSKI PA, FIGUEIREDO CP, CARGNIN-FERREIRA E, DA CUNHA C, TAKAHASHI RN. 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156: 830–840.

TAN SKH, HARTUNG H, SHARP T, TEMEL Y. 2011. Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: A role for the subthalamic nucleus? *Neuropharmacology* 61(3): 387–399.

TANDBERG E, LARSEN JP, AARSLAND D, LAAKE K, CUMMINGS JL. 1997. Risk factors for depression in Parkinson disease. *Arch Neurol* 54(5):625-630.

TESEI S, ANTONINI A, CANESI M, ZECCHINELLI A, MARIANI CB, PEZZOLI G. 2000. Tolerability of paroxetine in Parkinson's disease: a prospective study. *Mov Disord* 15(5):986-989.

THOBOIS S, LHOMMÉE E, KLINGER H, ARDOUIN C, SCHMITT E, BICHON A, KISTNER A, CASTRIOTO A, XIE J, FRAIX V, PELISSIER P, CHABARDES S, MERTENS P, QUESADA JL, BOSSON JL, POLLAK P, BROUSSOLLE E, KRACK P. 2013. Parkinsonian apathy responds to dopaminergic stimulation of D2/D3 receptors with piribedil. *Brain* 136(Pt 5):1568-1577.

THOMAS TAYRA J, KAMEDA M, YASUHARA T, AGARI T, KADOTA T, WANG F, KIKUCHI Y, LIANG H, SHINKO A, WAKAMORI T, VCELAR B, WEIK R, DATE I. 2013. The neuroprotective and neurorescue effects of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1502:55-70.

TIERNEY PL, THIERRY AM, GLOWINSKI J, DENIAU JM, GIOANNI Y. 2008. Dopamine modulates temporal dynamics of feedforward inhibition in rat prefrontal cortex in vivo. *Cereb Cortex* 18(10):2251-2262.

TOPS M, KOOLE SL, IJZERMAN H, BUISMAN-PIJLMAN FT. 2014. Why social attachment and oxytocin protect against addiction and stress: Insights from the dynamics between ventral and dorsal corticostriatal systems. *Pharmacol Biochem Behav* 119:39-48.

- TREADWAY MT, PIZZAGALLI DA. 2014. Imaging the pathophysiology of major depressive disorder - from localist models to circuit-based analysis. *Biol Mood Anxiety Disord* 4(1):5.
- TRITSCH NX, SABATINI BL. 2012. Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron* 76(1):33–50.
- UNGERSTEDT U. 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:95-122.
- URETSKY NJ, IVERSEN LL. 1969. Effects of 6-hydroxydopamine on noradrenaline-containing neurones in the rat brain. *Nature* 221(5180): 557–559.
- VAN AERDE KI, FELDMEYER D. 2013. Morphological and Physiological Characterization of Pyramidal Neuron Subtypes in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 25(3):788-805.
- VERSTRAETEN A, THEUNS J, VAN BROECKHOVEN C. 2015. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet* 31(3):140-149.
- VERTES RP. 2004. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse* 51:32–58.
- VOLMAN SF, LAMMEL S, MARGOLIS EB, KIM Y, RICHARD JM, ROITMAN MF, LOBO MK. 2013. New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. *J Neurosci* 33(45):17569-17576.
- VRIEND C, PATTIJ T, VAN DER WERF YD, VOORN P, BOOIJ J, RUTTEN S, BERENDSE HW, VAN DEN HEUVEL OA. 2014. Depression and impulse control disorders in Parkinson's disease: Two sides of the same coin? *Neurosci Biobehav Rev* 38:60-71.
- WALSH JJ, HAN MH. 2014. The heterogeneity of ventral tegmental area neurons: Projection functions in a mood-related context. *Neuroscience* 282C:101-108.
- WANG J, HOEKSTRA JG, ZUO C, COOK TJ, ZHANG J. 2013. Biomarkers of Parkinson's disease: Current status and future perspectives. *Drug Discovery Today* 18(3-4): 155–162.

WARDENAAR KJ, GILTAY EJ, VAN VEEN T, ZITMAN FG, PENNINX BW. 2012. Symptom dimensions as predictors of the two-year course of depressive and anxiety disorders. *J Affect Disord* 136(3):1198-203.

WILLNER P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiol* 52(2):90-110.

YADID G, FRIEDMAN A. 2008. Dynamics of the dopaminergic system as a key component to the understanding of depression. *Prog Brain Res* 172:265-286.

YAMADA K, KOBAYASHI M, MORI A, JENNER P, KANDA T. 2013. Antidepressant-like activity of the adenosine A(2A) receptor antagonist, istradefylline (KW-6002), in the forced swim test and the tail suspension test in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 114-115:23-30.

YANG C, SHIRAYAMA Y, ZHANG JC, REN Q, HASHIMOTO K. 2015. Regional differences in brain-derived neurotrophic factor and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress. *Int J Neuropsychopharmacol* [Epub ahead of print].

ZAHODNE LB, MARSISKE M, OKUN MS, BOWERS D. 2012. Components of depression in Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 25(3):131-137.

ZALUSKA M, DYDUCH A. 2011. Bupropion in the treatment of depression in Parkinson's disease. *Int Psychogeriatr* 23(2):325-327.

ZARATE CA JR, PAYNE JL, SINGH J, QUIROZ JA, LUCKENBAUGH DA, DENICOFF KD, CHARNEY DS, MANJI HK. 2004. Pramipexole for bipolar II depression: a placebo-controlled proof of concept study. *Biol Psychiatry* 56(1):54-60.

ZHANG X, EGELAND M, SVENNINGSSON P. 2011. Antidepressant-like properties of sarizotan in experimental Parkinsonism. *Psychopharmacology* 218:621-634.

7 Anexos: publicações durante o período do doutorado
7.1 Produção relacionada ao projeto da tese

7.1.1 Filipe C. Matheus, Daniel Rial, Joana I. Real, Cristina Lemos, Reinaldo N. Takahashi, Leandro J. Bertoglio, Rodrigo A. Cunha, Rui D. Prediger. Temporal dissociation of striatum and prefrontal cortex uncouples anhedonia and depression in 6-OHDA-lesioned rats. [Artigo submetido à revista Molecular Neurobiology].

Molecular Neurobiology

Temporal dissociation of striatum and prefrontal cortex uncouples anhedonia and depression in 6-OHDA-lesioned rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research
Keywords:	Parkinson's disease; depression; anhedonia; social isolation; dorsolateral striatum; prefrontal cortex.
Corresponding Author:	Rui Prediger UNITED STATES
First Author:	Filipe C Matheus
Order of Authors:	Filipe C Matheus Daniel Rial Joana I Real Cristina Lemos Reinaldo N Takahashi Leandro J Bertoglio Rodrigo A Cunha Rui Prediger

February 02, 2015

Professor Nicolas G. Bazan, PhD
Editor
Molecular Neurobiology

Dear Editor,

Enclosed please find the copy of the manuscript entitled “**Temporal dissociation of striatum and prefrontal cortex uncouples anhedonia and depression in 6-OHDA-lesioned rats**”, which we hope you will consider for publication in *Molecular Neurobiology* as Original Research Manuscript.

7.1.2 Filipe C. Matheus, Daniel Rial, Joana I. Real, Cristina Lemos, Juliana Bem, Reinaldo N. Takahashi, Leandro J. Bertoglio, Rodrigo A. Cunha, Rui D. Prediger. Short-term memory impairments preceding motor impairment in 6-OHDA-lesioned rats: involvement of decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex. [Artigo em preparação para a revista *European Journal of Neuroscience*].

7.2 Outras produções

- 7.1 CONSTANTINO LC, PAMPLONA FA, MATHEUS FC, LUDKA FK, GOMEZ-SOLER M, CIRUELA F, BOECK CR, PREDIGER RD, TASCA CI. 2015. Adenosine A1 receptor activation modulates N-methyl-d-aspartate (NMDA) preconditioning phenotype in the brain. *Behav Brain Res* 282:103-110.
- 7.2 BEN J, DE OLIVEIRA PA, GONÇALVES FM, PERES TV, MATHEUS FC, HOELLER AA, LEAL RB, WALZ R, PREDIGER RD.. 2014. Effects of pentylentetrazole kindling on mitogen-activated protein kinases levels in neocortex and hippocampus of mice. *Neurochem Res* 39(12):2492-2500.
- 7.3 MORETTI M, MATHEUS FC, DE OLIVEIRA PA, NEIS VB, BEN J, WALZ R, RODRIGUES AL, PREDIGER RD. 2014. Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 6:341-359.
- 7.4 TREVISAN G, ROSSATO MF, HOFFMEISTER C, OLIVEIRA SM, SILVA CR, MATHEUS FC, MELLO GC, ANTUNES E, PREDIGER RD, FERREIRA J. 2013. Mechanisms involved in abdominal nociception induced by either TRPV1 or

TRPA1 stimulation of rat peritoneum. *Eur J Pharmacol* 714(1-3):332-344.

- 7.5 CASTRO AA, WIEMES BP, MATHEUS FC, LAPA FR, VIOLA GG, SANTOS AR, TASCA CI, PREDIGER RD. 2013. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1513:103-116.
- 7.6 LUCENA GM, MATHEUS FC, FERREIRA VM, TESSELE PB, AZEVEDO MS, CECHINEL-FILHO V, PREDIGER RD. 2013. Effects of ethanolic extract and naphthoquinones obtained from the bulbs of *Cipura paludosa* on short-term and long-term memory: involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112(4):229-235.
- 7.7 MATHEUS FC, AGUIAR AS JR, CASTRO AA, VILLARINHO JG, FERREIRA J, FIGUEIREDO CP, WALZ R, SANTOS AR, TASCA CI, PREDIGER RD. 2012. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Behav Brain Res* 235(2):263-272.
- 7.8 PREDIGER RD, AGUIAR AS JR, MATHEUS FC, WALZ R, ANTOURY L, RAISMAN-VOZARI R, DOTY RL. 2012. Intranasal administration of neurotoxins in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 21(1):90-116.
- 7.9 PREDIGER RD, MATHEUS FC, SCHWARZBOLD ML, LIMA MM, VITAL MA. 2012. Anxiety in Parkinson's disease: a critical review of experimental

and clinical studies. *Neuropharmacology* 62(1):115-124.

- 7.10 PREDIGER RD, AGUIAR AS JR, MOREIRA EL, MATHEUS FC, CASTRO AA, WALZ R, DE BEM AF, LATINI A, TASCA CI, FARINA M, RAISMAN-VOZARI R. 2011. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 17(5):489-507.
- 7.11 Trabalho apresentado como comunicação oral no evento Society for Neuroscience 2013 cujo título foi: *“Time-dependent involvement of dorsolateral striatum in cognitive and emotional impairments in an experimental model of Parkinson`s disease”*.